

Orexin jelentősége a vízanyagcsere, valamint a vazopresszin kiválasztás szabályozásában

Ph.D. értekezés

Karcsúné Kis Gyöngyi

Témavezetők:

Prof. Dr. László A. Ferenc, tudományos tanácsadó

Dr. Varga Csaba, egyetemi docens

Prof. Dr. László Ferenc, egyetemi tanár [†]

Biológia Doktori Iskola

**ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**

2012

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Az értekezésben előforduló rövidítések.....	3
1. Bevezetés.....	5
1.1. Az orexin neuropeptidok jellemzése	5
1.2. Az orexinerg rendszer centrális kapcsolatai	6
1.3. A vazopresszin (VP) kiválasztás centrális regulációja.....	7
1.4. A monoaminerg rendszer és interakcióinak szerepe	8
2. Célkitűzések	10
3. Általános módszerek.....	11
3.1. <i>In vivo</i> kísérletek leírása.....	11
3.2. NH sejtenyésztés készítésének leírása	13
3.3. VP meghatározás - RIA	15
3.4. Fehérje meghatározás.....	16
3.5. Statisztikai analízis:.....	16
4. <i>In vivo</i> vizsgálatok	17
4.1. Az orexinek hatása a táplálékfelvételre.....	17
4.2. Az orexinek hatása a vízfelvételre.....	19
4.3. Az orexin-A jelentősége a VP kiválasztás szabályozásában	23
4.4. <i>In vivo</i> eredmények megbeszélése.....	27
4.5. Következtetések.....	29
5. <i>In vitro</i> vizsgálatok	30
5.1. Orexin-A és orexin-B kezelés hatása a VP kiválasztásra	34
5.2. Monoaminerg indukciót követő VP szint változások orexin-A-val történő pre- és posztinkubációt követően	35
5.3. Monoaminerg indukciót követő VP szint változások orexin-B-vel történő pre- és posztinkubációt követően.....	39
5.4. <i>In vitro</i> eredmények megbeszélése.....	42
5.5. Következtetések.....	45
Összefoglalás.....	46
Summary.....	49
Zárszó.....	52
Köszönetnyilvánítás.....	53
Irodalomjegyzék.....	55
Tudományos publikációk listája.....	66

Az értekezésben előforduló rövidítések

5-HT	szerotonin
ACTH	adrenokortikotrop hormon
ADH	antidiuretikus hormon
ADR	adrenalin
ARC	nucleus arcuatus
CRH	corticotropin-releasing hormon
CSF	cerebrospinális folyadék
DA	dopamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
HA	hisztamin
i.c.v.	intracerebroventrikuláris
i.p.	intraperitoneális
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
i.v.	intravénás
LHA	laterális hypothalamus
NADR	noradrenalin
NH	neurohypophysis
OX₁R	orexin-1 receptor
OX₂R	orexin-2 receptor
PBS	foszfát puffer
PVN	nucleus paraventricularis
qRT-PCR	„quantitative real time” polimeráz láncreakció

SEM	standard error of mean
SON	nucleus supraopticus
VP	vazopresszin
WB	western blot

1. Bevezetés

1.1. Az orexin neuropeptidek jellemzése

1998-ban izoláltak két, szerkezetüket tekintve némileg eltérő neuropeptidet, a hypocretin-1-et és hypocretin-2-t (1, 2). A két vegyületet később étvágyfokozó hatásukról a görög orex (jelentése: étvágy) szó után orexin-A-nak és orexin-B-nek nevezték el. Orexin kizárólag a laterális hypothalamus területén termelődik, és projekciói révén innen jut el a központi idegrendszer más területeire. A 33 aminosavból álló orexin-A két diszulfidhidat tartalmaz (Cys⁶⁻¹² és Cys⁷⁻¹⁴), míg az orexin-B 28 aminosavból álló lineáris peptidlánc. Az orexin-A teljes aminosav szekvenciája: Pyr-Pro-Leu- Pro- Asp- Cys- Cys- Arg- Gln- Lys- Thr- Cys- Ser- Cys- Arg- Leu- Tyr- Glu- Leu- Leu- His- Gly- Ala- Gly- Asn- His- Ala- Ala- Gly- Ile- Thr-Leu- NH₂, az orexin-B pedig a következő sorrendből tevődik össze: Arg- Ser- Gly- Pro- Pro- Gly- Leu- Gln- Gly- Arg- Leu- Gln- Arg- Leu- Leu- Gln- Ala- Ser- Gly- Asn- His- Ala- Ala- Gly- Ile- Leu- Thr- Met- NH₂. A humán, a marha, az egér és a patkány orexin megegyezik, a két orexin típus 46%-os homológiát mutat (3).

Specifikus receptoraik G-fehérjéhez kapcsolt transzmembrán receptorok. Az orexin-1 (OX₁R) és orexin-2 receptor (OX₂R) jellemzője, hogy az orexin-A mintegy tízszer nagyobb affinitással kötődik az OX₁R-hoz, mint az orexin-B, ugyanakkor az OX₂R-hoz való kötődésük azonos mértékű (2).

1.2. Az orexinerg rendszer centrális kapcsolatai

Orexinerg neuronok efferenciáját a központi idegrendszer több területén megfigyelték és viszont, számos területről kapnak afferenseket az orexin neuronok (4). Ezen kapcsolatok és ehhez tartozó megfigyelések alapján írták le az orexin étvágyfokozó hatásán túl számos más élettani folyamatban betöltött szerepét.

Az orexin tartalmú neuronok axonvégződéseit a nucleus arcuatus (ARC) területén kimutatták, ahol dopamin (DA), neuropeptid Y (NPY) és proopiomelanocortin (POMC) termelés folyik, amelyek ismert táplálékfelvételt szabályozó peptidek. Feltehetően ez a kapcsolat lehet a felelőse az orexin táplálékfelvételt fokozó hatásának (5).

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal intenzív orexin pozitivitást mutattak ki a locus coeruleus magcsoportjában, mely noradrenerg központ révén az ébrenlét fenntartásában játszik fontos szerepet. Az agytörzsi raphe-magok dorzális csoportjának innerválása az innen a nucleus suprachiasmaticusba „feed back” információt küldő szerotoninergerg neuronok közvetítésével a cirkadián ritmus kialakításában is részt vesz (6, 7).

A hypothalamus hisztaminerg tuberomamilláris magja is szerepet játszik a cirkadián ritmus, az alvás-ébrenlét alakításában. Számos orexin neuron végződik ezeken a sejteken is (8).

Kutatásaink alapját szolgáló ismeretek azt mutatják, hogy az orexinek ozmoszenzitív területeket is stimulálnak: orexin receptor immunreaktivitás figyelhető meg a hypothalamus magnocelluláris régiójához tartozó nucleus supraopticus (SON) és nucleus paraventricularis (PVN) magcsoportokon (9). Az orexin jelentős szerepet játszik a neuroendokrin regulációban (10-13). Több adat szól amellett, hogy az orexin részt

vesz a vízyangcsere szabályozásában: intracerebroventrikulárisan (i.c.v.) adagolva fokozza a vízfelvételt és a vizeletürítést (9), az orexin szempontjából involvált laterális hypothalamus lézió csökkenti a vízfogyasztást (14), a szomjajás emeli a hypothalamusban a 130 aminosavat tartalmazó orexin precursor prepro-orexin mRNS szintet (15).

Feltételezhető, hogy az orexin, mint peptid modulátor szerepet játszik a hypothalamo-neurohypophysealis rendszer regulációjában. Erre utalnak azok a megfigyelések, amelyek az orexin és a hypothalamus magnocelluláris régiója – mindenekelőtt a PVN - morfológiai és funkcionális kapcsolatát bizonyítják (13, 16-20).

1.3. A vazopresszin (VP) kiválasztás centrális regulációja

A VP a hypothalamus magnocelluláris régiójának SON és PVN magcsoportjaiban termelődik és axonális transzporttal a hypophysis nyélen keresztül jut el a hypophysis hátsó lebenyébe neuroszekréciós granulumok formájában (21). Általánosan elfogadott tény, hogy a NH csak mint a VP raktározás színtere játszik szerepet, itt kerül a vérkeringésbe (22). Témavezetőm, Dr. László A. Ferenc és munkatársai tömegspektroszkópiás módszerrel azonosítottak izolált NH sejtkultúra felülúszó médiumában megjelenő VP-t (23) és leírták, hogy a pituicyták VP termelésre és kiválasztásra képesek (24). VP prekursor peptidet és mRNS-t is megfigyeltek NH-ben (25, 26). Ugyanakkor hypophysis-nyél roncsolása után ozmotikus ingert követően a hátsó lebenyből VP mRNS-t nem tudtak kimutatni (27), míg mások 7-10 nappal a nyél roncsolását követően VP mRNS expressziót találtak pituicyták egy részében (28).

Három VP receptor típus ismert. A V_{1a} receptorok inozitol-trifoszfát rendszeren keresztül fejtik ki hatásukat az erek endotéljében és a májban (29-31). Az adenohypophysisben

V_{1b} receptorok találhatók (32), amelyek az ACTH rendszerre fejtik ki hatásukat, a V₂ receptorok pedig a vese disztális tubulus hámsejtjeinek bazolaterális membránjában találhatók és adenilát-cikláz aktivitáson keresztül érvényesítik antidiuretikus hatásukat (33).

A VP kémiai szerkezetét tekintve egy hat aminosavat tartalmazó gyűrűből és az ehhez kapcsolódó tripeptid-amid oldalláncból felépülő, kilenc aminosavból álló nonapeptid (34).

A VP emeli az artériás vérnyomást (35), a vércukorszintet (36), fokozza a bélperisztaltikát (37) és emellett befolyásolja a tanulási és memóriefolyamatokat is (38).

Legfőbb biológiai hatása az antidiuretikus effektus, amiről az antidiuretikus hormon (ADH) elnevezést is kapta és kutatásaink központi szereplője, hiszen kulcsszerepet játszik a vízháztartásban (39).

1.4. A monoaminerg rendszer és interakcióinak szerepe

Számos kutatási eredmény igazolja, hogy az agy monoamin vegyületei, a hisztamin (HA) (40, 41), a DA (42, 43), szerotonin (5-HT) (44, 45) és az adrenerg rendszer (46, 47) is szerepet játszhatnak a VP kiválasztás regulációjában. Korábban munkatársaim, Dr. Gálfi Márta vezetésével, izolált neurohypophysis sejtenyészetben kimutatták a monoaminerg vegyületek VP kiválasztást fokozó hatását (48-50). További vizsgálati eredmények - melyek bemutatása Dr. Molnár H. Andor doktori disszertációjának nagy részét is képezi - alátámasztották az említett neuroaktív vegyületek VP szekréciót fokozó hatását *in vivo* körülmények között is. Bizonyították továbbá, hogy a VP regulációja monoaminerg rendszer és egy peptid modulátor, a galanin közreműködése révén a hypophysis hátsó lebenyének szintjén is kimutatható.

A fent leírt megállapításokból kiindulva jelen kísérletsorozatunkban vizsgáltuk, hogy az orexin neuropeptidek hogyan befolyásolják izolált patkány NH sejttenyészetben és *in vivo* körülmények között a VP termelést és kiválasztást.

2. Célkitűzések

1. Hím Wistar patkányokon végzett (*in vivo*) kísérletek célja:

- a. a táplálékfelvétel változásának monitorozása az orexin neuropeptidek centrális adagolását követően
- b. a vízfelvétel vizsgálata orexin-A és orexin-B i.c.v. adagolását követően
- c. orexin i.c.v. adagolása után ozmotikus stimulust (i.p. 2,5%-os NaCl oldat) követő VP koncentráció vizsgálata
- d. i.c.v. adagolt orexin hatásának mérése nem-ozmotikus inger (HA) által kiváltott VP koncentráció változására
- e. OX₁R antagonistá (SB 408124) inhibitor hatásának vizsgálata az orexin-A által kiváltott VP szekréciós változásaira

2. *In vitro* kutatásaink a következő kérdések megválaszolására irányultak:

- a. NH sejtkultúra VP kiválasztására direkt módon hatnak-e az orexinek?
- b. módosítják-e az orexinek (és ha igen, akkor a két neuropeptid hatása között van-e különbség) a monoaminerg vegyületekkel előidézett VP kiválasztást a sejtenyészeti pituicytáiban?
- c. befolyásolják-e az orexinek az aspecifikus ozmotikus inger (K⁺ adagolás) VP szekrécióra kifejtett hatását?
- d. az OX₁R antagonistá alkalmazásával kivédhető-e az orexin-A okozta esetleges változás a monoaminerg vegyületek által kiváltott VP koncentráció növekedésében?

3. Általános módszerek

3.1. *In vivo* kísérletek leírása

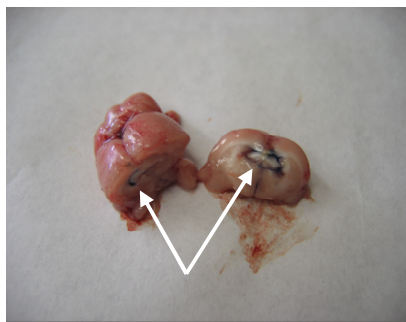
Állatok:

180-250 gramm súlyú hím Wistar patkányokat használtunk kísérleteinkhez. Az állatokat a Domaszéki Állatházból rendeltük minden esetben és ketrecenként 5 állatot tartottunk standard körülmények között (12 órás világítás reggel 8 órától, 23 ± 2 °C hőmérséklet, csapvíz és granulált patkánytáp (LATI, Gödöllő) *ad libitum*). Az állatok tartási körülményei és a kísérletek menete a SZTE Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság előírásainak megfelelt.

Centrális kanül beépítése:

Az állatokat 1 héttel az érkezésük után, steril körülmények között műtöttük. Éteres (MOLAR Chemicals Kft., Budapest) altatást követően sztereotaxiás készülékben (David Kopf Instruments, CA, USA) rögzítettük a patkányokat. A fejbőr fül- és szemvonal közötti részét ollóval eltávolítottuk, majd a seb környékének letisztítása után a sebre hidrogén-peroxidos (MOLAR Chemicals Kft., Budapest, 30%) vattát helyeztünk fertőtlenítés és a kötőszövetek (csonthártya is) eltávolítása érdekében. Kb. 1 perc elteltével a koponyának ezen részét alaposan megtisztítottuk és szárazra töröltük. A jobb parietális csontba kis lyukat fúrtunk 4 mm mélységben. A fúráshoz injekciós tűből (LUER 20GG ½ 38/9) gyártott kézi fúrót használtunk, melyet 4 mm-nél megjelöltünk. A fúrás pontos helyének meghatározásához Paxinos és Watson sztereotaxiás atlaszát használtuk (51) – a lyuk 0,7 mm anterior és 1 mm laterális irányban volt a Bregmától minden esetben. A lyukon keresztül kanült (PlasticOne Guide Cannula, 0.4 x 4 mm) helyeztünk a jobb oldali laterális agykamrába. A kanült gyorsan szilárduló fogászati cementtel (Adhesor cink-

foszfát cement, SpofaDental, Csehország) rögzítettük a koponyacsont felszínéhez. A fejbőrt egy öltéssel a kanül körül összehúztuk. A műtétet követően az állatokat 1 hétig hagytuk pihenni. A kísérleteket követően a kanülon keresztül 1%-os metilénkék festéket (Reanal, Budapest) fecskendeztünk az agyba és a koponyából kiemelve megvizsgáltuk a keresztmetszetét. Amennyiben a kanül megfelelő helyen volt, a kamrákban megjelent a festék (1. kép). Hibásan behelyezett kanülok (kb. 8,5%-ban) esetén az eredményeket az értékelésből kihagytuk.



1. kép: Kamra festődése metilénkéssel megfelelő kanülbehelyezés után
(nyíl: festék megjelenése a kamrákban sikeres kanülbeépítés esetén)

Anyagok beadása:

Az állatoknak éteres bódításban adagoltuk az anyagokat. Az anyag bejuttatásához Hamilton fecskendőre erősített műanyag kanült használtunk, melynek végén lévő MEDICOR NEOMED 25G típusú steril tű pont illeszkedett az általunk beépített kanülbe. A beültetett kanült injekálás előtt óvatos forgó mozdulatokkal tisztítottuk.

Táplálékfelvétel mérése:

Minden esetben reggel 9 óra körül kezdtük a megfigyelést. A kísérlet megkezdése előtt 2 órával az állatoktól megvontuk a vizet. Az állatoknak éteres altatásban i.c.v. adtuk be az anyagokat. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak, a kezelték pedig különböző

koncentrációban, fiziológias sóoldatban oldott orexint kaptak. Az OX₁R antagonistát az orexin-A-val együtt adagoltuk i.c.v. Az állatokat az anyagok beadása után szeparált ketrecekbe helyeztük és számukra lemerített mennyiségű táprudat biztosítottunk. Az elfogyasztott táprúd mennyiségét (gramm) mértük 1, 2 és 4 óra elteltével. A kísérlet végén az eredményeket korrigáltuk a táprúdról lehullott törmelék mennyiségével.

Vízfelvétel mérése:

A reggel 9 órakor induló kísérlet megkezdése előtt 2 órával az állatoktól megvontuk az ételt. A kísérlethez a táplálékfelvétel mérésénél leírt módon adagoltuk az anyagokat és a szeparált ketrecbe helyezéstől számított 2, 4 és 6 óra elteltével olvastuk le az elfogyasztott víz mennyiségét (ml).

Mintavétel plazma VP szint méréséhez:

30 perccel az orexinek i.c.v., 15 perccel a hiperozmotikus sóoldat vagy hisztamin adagolása után a patkányokat dekapitáltuk és a vérmintákat hűtött, Na₂EDTA-s (3 mg/ml, Sigma, Németország) polisztrén csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálást követően (4 °C, 4000rpm, 20 perc) a felülúszó vérplazmából a VP mennyiségét RIA módszerrel határoztuk meg 72 órán belül. A VP meghatározásig a mintákat -80°C-on tároltuk.

3.2. NH sejtenyésztés készítésének leírása

A sejtenyészetekkel folytatott kísérleteinket Dr. Gálfi Márta tanárnő irányításával hajtottuk végre.

A pituicyták, azaz a NH sejteji módosult gliasejteknek tekinthetők. Az enzimatis emésztési módszereinket speciálisan a gliasejtekre leírt eljárások képezték (52, 53), a tenyésztési folyamat többi részét korábbi publikációk tárgyalják (23, 24, 54, 55).

Pentobarbitál (4,5 mg/kg Nembutal, Abbott, USA) altatásban steril körülmények között távolítottuk el hím Wistar patkányok (180-230 g) hypophysisét. Preparáló mikroszkóp alatt óvatosan elválasztottuk a hátsó és a középső lebenyt. A továbbiakban a hátsó lebennyel dolgoztunk, melyet enzimatikus emésztésnek vetettünk alá. Az emésztési folyamat 37 °C-on zajlott, a következő sorrendben:

- 0,2% tripszin (Sigma, Steinheim, Németország) PBS-ben, 30 perc;
- 30 µg/ml kollagenáz (Sigma), 60 perc;
- 300 IU/ml diszpáz (Sigma), 30 perc;
- 10 µg/ml DN-áz I és II (Sigma), 2 x 30 perc
- 100 µg/ml tripszin inhibitor (Sigma), STOP.

A sejtenyészetet 3-szor mostuk át PBS-ben és nylon blutex szűrőn át (pórusátmérők: 100 µm, 80 µm, 48 µm) mechanikailag disszociáltuk. A sejtszám meghatározását Bürker-kamrával és áramlásos cytometriás méréssel végeztük (2×10^6). A sejtek viabilitását Trypan-kék (Sigma) oldattal festett környezetben vizsgáltuk. Ez a festékmolekula nem jut át fiziológiailag ép membránon, így az egészséges sejtek nem festődnek. Amennyiben a nem festődő sejtek száma $\geq 95\%$, a szuszpenziót alkalmasnak találtuk a kísérlet elvégzéséhez. A sejteket ezután 2×10^5 sejt/ml koncentrációban, patkány farok kollagénnel bevont, 24 lyukú tenyésztőedényekbe (Costar, USA) helyeztük és 37 °C-on tartottuk 5% CO₂ jelenlétében. A sejtkultúrákat naponta mostuk tápoldattal (DMEM-t (Sigma), 20% marha magzati szérumot (Gibco, USA), 100 µg/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott), majd konfluenssé válásuktól kísérleti modellként alkalmaztuk.

A sejtenyésztés indulásától mértük a felülúszó médium VP szintjét, hogy a hormonszekréció időbeli változását regisztráljuk. Korábbi megfigyeléseket alátámasztva,

a hormonszekréció a sejtenyészetben az 5-6. napon érte el a detektálható szintet, fokozatos koncentrációnövekedés után a 13-14. napon vált konstanssá, így ez utóbbi időpontot választottuk a hormon kiválasztás vizsgálatára.

3.3. VP meghatározás - RIA

A vérplazma mintákból és a sejtenyészet felülúszójából is RIA módszerrel határoztuk meg a VP mennyiségét a SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratóriumában Dr. Gardi János tudományos munkatárs irányításával.

A sejtenyészetből 2 órával a tápoldat cserélése után 500 µl-t kivettünk és mérésig -80 °C-on tároltuk. A vérplazmából a mérésekhez 1 ml-t használtunk.

Sejtenyészet felülúszó médiumából extrakció nélkül történt a VP meghatározás, vérplazmánál szükség volt ezen eljárásra.

Az extrakció párhuzamos minták alkalmazásával történt, kalibrációs görbét 1-128 pg/cső tartományban készítettük 1 ml VP mentes plazmában hígítva, melyet Brattleboro homozygóta diabetes insipidus-os patkányokból (CPB-TNO, Zeist, Hollandia) nyertük. Az extrakcióhoz Sep-Pak Classic C18 (Waters, Írország) oszlopokat használtunk. Bepárlás (55 °C-on, folyamatos N₂ áram mellett) után az extrahált mintákat RIA pufferben (56) feloldottuk.

A RIA módszert Dogterom és munkatársai (56) szerint végeztük kisebb módosításokkal (57). Az eljárás során birkában termelt VP antitestet alkalmaztunk, melyet a VP-(ε-aminocapriocsav)-thyreoglobulin konjugáttal szemben képeztek. A I¹²⁵ izotópos jelöléshez szintetikus VP-t (Sigma, Németország) használtunk és a Hunter és Greenwood módszert alkalmaztuk (58). A jelzett hormont Janáky és munkatársai szerint

kromatográfiával tisztítottuk (59). Az így kapott jelzett VP specifikus aktivitása 49,9-61,1 Tbq/mmol.

Az antiszérum hígítás 1:350000 volt. A keresztreakció 23.3% a lizin-8-vazopresszinnel (Organon, Oss, Hollandia), 0.12% a desglycinamid-9-arginin-vazopresszinnel (Organon), kevesebb, mint 0.01% az oxitocinnal (Richter, Budapest, Magyarország), 0.03% az 1-24 ACTH-val (Organon) és 10.7% az 1-deamino-8-arginin-vazopresszinnel (Per Melin, Ferring Research Laboratory, Malmö, Svédország).

A módszer érzékenysége 1 pg/ml, az intra- és interassay koefficiense 13,3%. Az adatokat *in vivo* kísérletek esetében pg/ml plazma, illetve *in vitro* kísérletek esetében pg/mg fehérje egységben tüntettük fel.

3.4. Fehérje meghatározás

A minták fehérje tartalmának meghatározását spektrofotometriás úton, Lowry által leírt módszerrel végeztük (60).

3.5. Statisztikai analízis:

A vizsgálataink során kapott adatokat az egyes kísérleti csoportok átlagértékei és a középérték szórása alapján értékeltük. Az *in vivo* kísérletek eredményeit Krukal-Wallis próbának vetettük alá, míg az *in vitro* körülmények között kapott értékek statisztikai elemzését Tukey-Kramer-féle páros összehasonlítással végeztük. A $p < 0,05$ különbséget szignifikánsnak tekintettük.

4. *In vivo* vizsgálatok

4.1. Az orexinek hatása a táplálékfelvételre

Bevezetés

Leírásuk óta az orexin neuropeptidek étvágyfokozó és táplálkozási viselkedést befolyásoló hatását vizsgálták a legszélesebb körben a cirkadián ritmus, az ébrenlét fenntartásában betöltött szerepük mellett. Patkányokban nappal adagolva növeli a táplálékfelvételt (61), míg éjszaka, amikor ezek az állatok normál körülmények között aktívak, a táplálékfelvételüket nem befolyásolja (62). 1-2 napos éheztetés után kimutatták, hogy az orexin neuronokban közel megkétszereződött a prepro-orexin mRNS mennyisége, bizonyítva az étvágyfokozás kialakításban betöltött szerepét (63). Sweet és munkatársai vizsgálták különböző területekre centrálisan adagolt orexin-A és orexin-B hatását, ez alapján a hypothalamus és környékére injektált orexin-A fejtett ki táplálékfelvételt fokozó hatást mintegy 2 óra eltelte után is (64). Más publikációk az orexin-B kisebb hatékonyságáról (2) vagy akár hatástalanságáról (16, 65) számolnak be az orexin-A-hoz képest. Általánosan elfogadott, hogy az i.c.v. adagolás fokozza a táplálékfelvételt, az i.p. adagolás hatástalan (66), így az általunk végzett vizsgálatok az utóbbi adagolási módra nem terjedtek ki.

Táplálkozási viselkedést tanulmányozó kísérleteinkkel a Tóth Gábor professzor vezetésével az SZTE ÁOK Orvosvegytani Intézetében szintetizált orexinek hatásosságát is kívántuk igazolni.

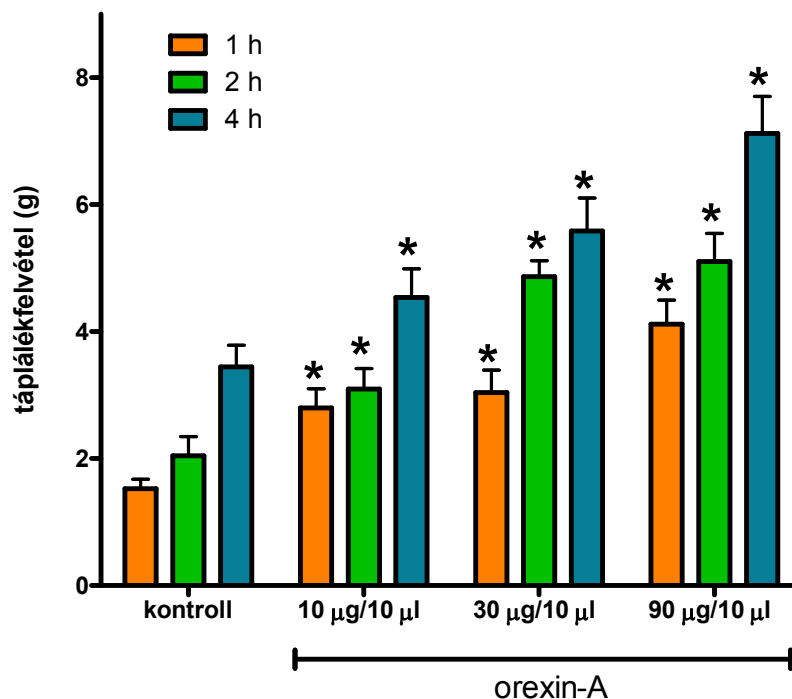
Anyagok és módszer

A 3.1. pontban leírtak szerint műtöttük az állatokat és végeztük a kísérleteket.

Az orexint 10 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$, 30 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ és 90 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ mennyiségekben i.c.v. adagoltuk. Az orexint fiziológiás sóoldatban oldottuk. A kontroll állatok minden esetben 10 μl fiziológiás sóoldatot kaptak. A dózisokat Kunii közleménye alapján választottuk (15).

Eredmények

1, 2 és 4 órával az orexin-A i.c.v. adagolását követően a kontroll csoporthoz képest dózistól függő szignifikáns növekedést tapasztaltunk a felvett táplálék mennyiségében (1. ábra).



1. ábra: Orexin-A hatása a táplálékfelvételre (dózis-hatás vizsgálat).

(n= 10; átlag \pm S.E.M., *: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; p< 0,05)

4.2. Az orexinek hatása a vízfelvételekre

Bevezetés

Étvágyfokozó hatásán túl az orexineknek jelentős szerepük lehet a vízyanyagcsere szabályozásában, ezt néhány irodalmi adat alátámasztja (15, 16). Orexin-tartalmú neuronok a laterális hypothalamus (LHA) területén találhatók, a LHA léziója nemcsak aphágiához, hanem adipsiához is vezet (67-69). Másrésről ugyanezen régió elektromos, illetve kémiai ingerekkel történő stimulációja megnöveli a vízfelvételt (70, 71). Megfigyelték továbbá, hogy ivás közben a LHA neuronjai aktiválódnak (72).

Ezek alapján különböző dózisban centrálisan bejuttatott orexin-A és orexin-B hatását vizsgáltuk a vízfelvétel tekintetében. Megnéztük továbbá, hogyan befolyásolja az OX₁R-ra szelektív antagonistá a vízfelvétel alakulását önállóan és orexin-A-val egyidejűleg adagolva.

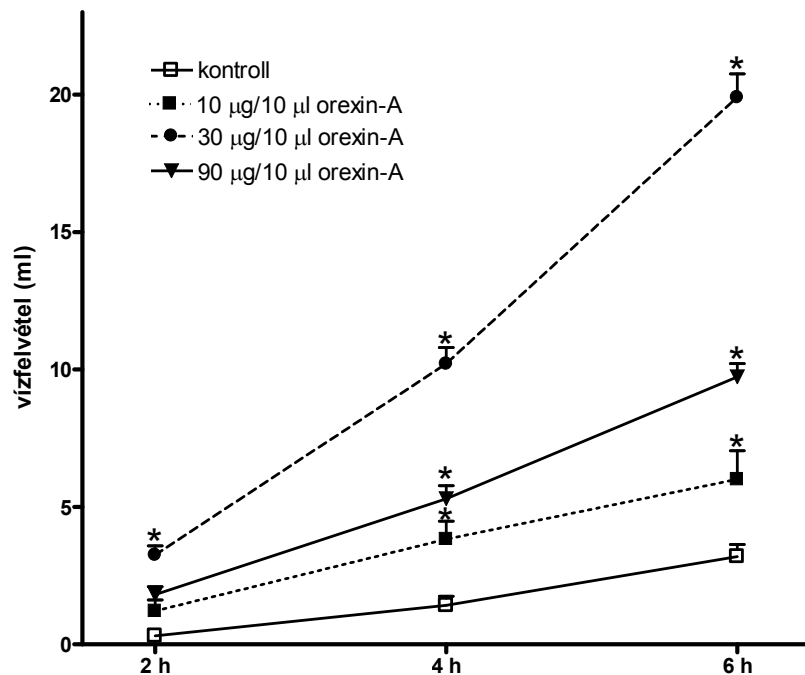
Anyagok és módszer

Az állatokat a 3.1. pontnak megfelelően kezeltük és vizsgáltuk a vízfelvétel változását.

Az orexint 10 µg/10 µl, 30 µg/10 µl és 90 µg/10 µl mennyiségekben adagoltuk centrálisan, fizioológias sóoldatban oldva. A kontroll állatok minden esetben i.c.v. 10 µl fizioológias sóoldatot kaptak. A dózisokat Kunii közleménye alapján választottuk (15). Az OX₁R-ra szelektív antagonistát (SB 408124, C₁₉H₁₈F₂N₄O; N-6,8-Difluoro-2-methyl-4-quinoliny)-N'-[4-(dimethylamino)phenyl]urea, Sigma, Németország) az orexin-A-val egyidejűleg adagoltuk 30 µg/10 µl dózisban.

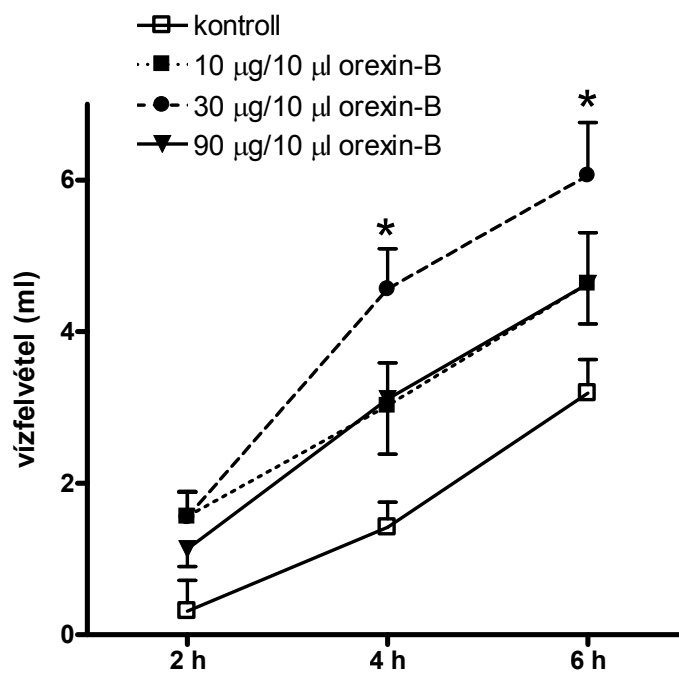
Eredmények

Orexin-A adagolását követően a kontroll csoporthoz képest megnövekedett vízfogyasztást tapasztaltunk. A vízfelvétel dóziszfüggő alakulását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a fogyasztott víz mennyisége megnőtt a legkisebb alkalmazott dózis esetén is (10 µg/10 µl). Figyelemre méltónak találtuk, hogy a leghatásosabbnak a 30 µg/10 µl-os dózis bizonyult, a vízfelvétel jelentősen meghaladta a nagyobb (90 µg/10 µl) dózis alkalmazását követő változást (**2. ábra**).



2. ábra: Az i.c.v. adagolt orexin-A hatása a vízfelvételre 2,4 és 6 óra elteltével patkányban. (n=10; átlag±S.E.M.; *: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; p<0,05)

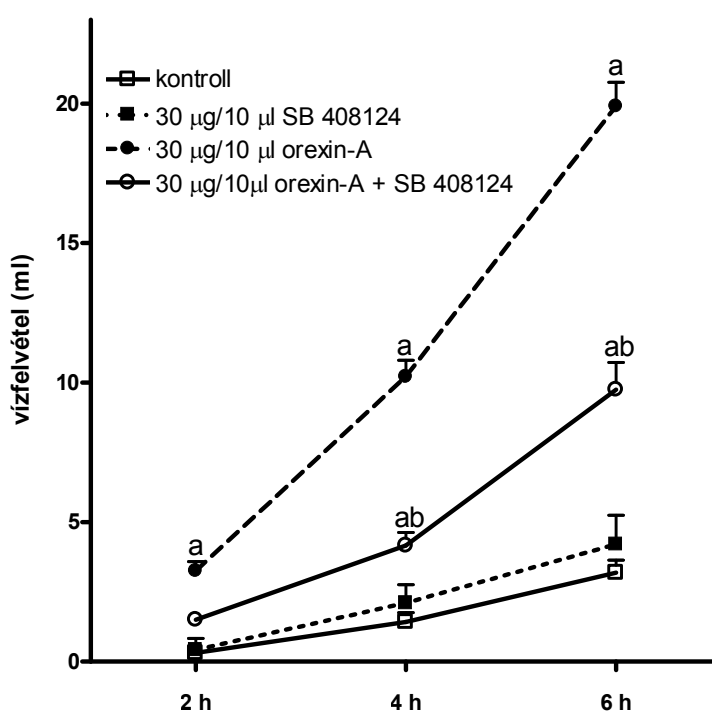
Megfigyeltük, hogy 10 µg/10 µl, illetve 90 µg/10 µl dózisban alkalmazott orexin-B szignifikáns növekedést nem okozott a vízfelvételben, 30 µg/10 µl dózis alkalmazása után 4 és 6 h periódusban a vízfogyasztás fokozódott a kontroll csoportokéhoz képest, az orexin-A-val kapott értékeket azonban nem érte el (3. ábra).



3. ábra Orexin-B kezelés hatása a vízfelvételre 2, 4 és 6 óra elteltével patkányban.

(n=10; átlag±S.E.M.; *: szignifikáns változás a kontroll csoporthoz képest; p<0,05)

A leghatásosabb 30 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ -es koncentrációt alkalmaztuk az OX_1R -ra szelektív antagonistá, az SB 408124 hatásának vizsgálatához. Eredményeink azt mutatták, hogy önmagában alkalmazva az antagonistát nem emelte meg a vízfogyasztás mértékét. Orexin-A-val szimultán adagolva azonban lényegesen visszaszorította a vízfogyasztást az orexin-A-val kezelt csoporthoz képest, de a kontroll csoportokhoz viszonyítva magasabb szinten maradt (**4. ábra**).



4. ábra: Orexin-A és SB 408124 kezelést követő vízfelvétel 2,4 és 6 óra elteltével patkányban. (n=10; átlag \pm S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest; ^b: szignifikáns különbség az orexin-A-val kezelt csoporthoz képest; p<0,05)

4.3. Az orexin-A jelentősége a VP kiválasztás szabályozásában

Bevezetés

Orexin tartalmú neuronok a hypothalamus laterális területén (73), és a vízháztartásban fontos szerepet játszó PVN és SON magcsoportokban az orexin receptorok jelenléte (9) a fent említett szerepére utal. A hypothalamo-hypophyseális tengely egyik regulátoraként (74, 75) a neuroendokrin folyamatokra is hatással van.

A vízyanyagcsere másik igen fontos szabályozója a hypothalamus magnocelluláris régiójában termelődő VP. A polydipsia - vagyis vízbevitel fokozódása - számos betegség kísérője lehet. A vízfelvétel növelése normál esetben csökkent VP szintet eredményez a vérben (76). Ismeretes, hogy dehidratáció vagy hipertóniás sóoldat bevitele jelentős növekedést eredményez a plazma VP szintjében (77).

A hypothalamusban neurotranszmitterként működő HA (78, 79) szerepet játszik az adenohypophysis hormonok szekréciójának szabályozásában (40) és a NH hormonok kiválasztásában (41). A HA aktiválja a SON és PVN neuronjait (80-83), hatására megemelkedik a VP mRNS szintje (81, 84). Gyorsan és erőteljesen növeli a plazma VP koncentrációját, mind i.p., mind i.c.v. adagolva (85-89). A HA-erg rendszer gátlása mérsékli a dehidratáció által előidézett VP szint emelkedést (81, 90, 91).

Ezen neuroanatómiai, funkcionális és farmakológiai kapcsolódások alapján kísérleteinkkel igazolni szeretnénk az orexinek vízháztartásra gyakorolt szerepét.

Különböző dózisban bejuttatott orexin-A és orexin-B hatását vizsgáltuk a vízfelvételre. Megnéztük, hogyan befolyásolja az orexin-A hatását az OX₁R-ra szelektív antagonisták önálló és orexin-A-val történő egyidejű alkalmazása.

Az orexin-A plazma VP szintjére gyakorolt hatását vizsgáltuk ozmotikus stimulust követően, valamint a specifikus receptor antagonistá szimultán adagolása mellett.

HA kezelést követő változásokat néztük a plazma VP szintjére orexin-A-val történő előkezelést követően és itt is megvizsgáltuk az antagonistá esetleges inhibitor hatását.

Anyagok és módszer

10 mg/100 g HA i.p. adagolása után 15 perc elteltével dekapitáltuk az állatokat és vérmintát gyűjtöttünk a plazma VP szintjének meghatározásához.

1 ml/100 g 2,5%-os NaCl adása után 15 perccel dekapitáltuk az állatokat és vérmintát gyűjtöttünk a plazma VP szintjének meghatározásához.

Az orexin-A és az SB 408124 bazális plazma VP szintre gyakorolt hatásának vizsgálatához az i.c.v. orexin-A adagolást követően 30 perccel dekapitáltuk az állatokat és gyűjtöttük a vért.

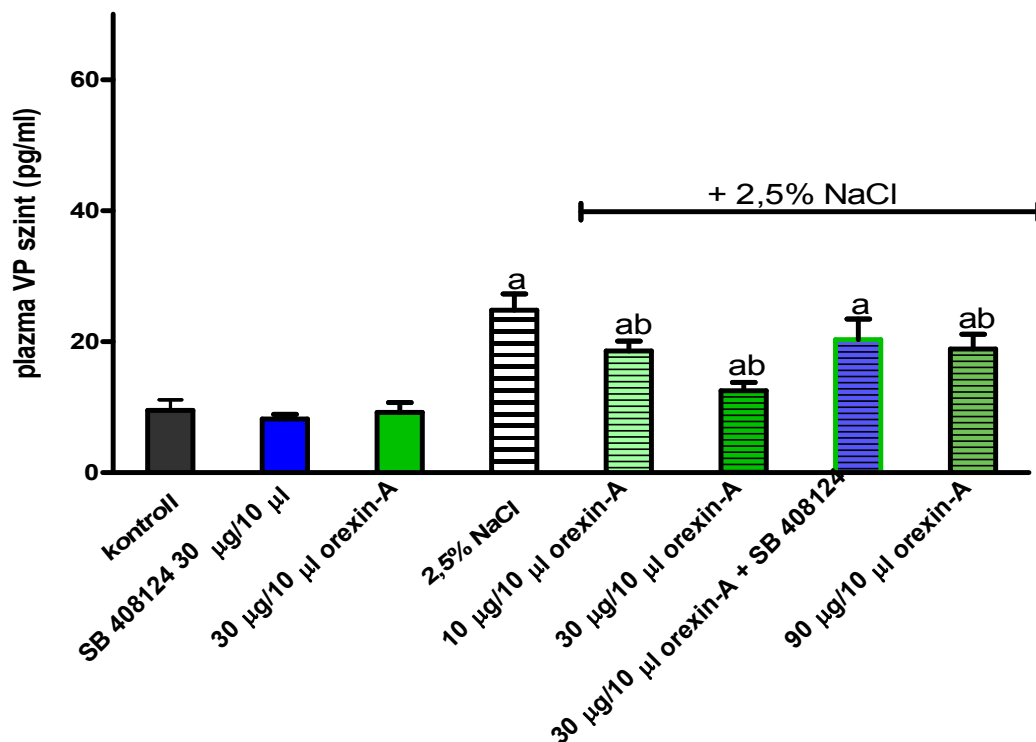
Az orexin-A és az SB 408124 megnövelt plazma VP szintre gyakorolt hatásának vizsgálatához az i.c.v. orexin-A adagolást követően 15 perccel adtuk be a plazma VP szintet stimuláló HA-t és hiperozmotikus NaCl oldatot i.p.

Az orexin-A-t 30 µg/10 µl-es dózisban alkalmaztuk - a vízfelvételre gyakorolt hatásában ez bizonyult a leghatékonyabbnak.

Az SB 408124 antagonistát 30 µg/10 µl dózisban alkalmaztuk, inhibitor hatásának megfigyeléséhez az orexin-A-val egyidejűleg adagoltuk centrálisan.

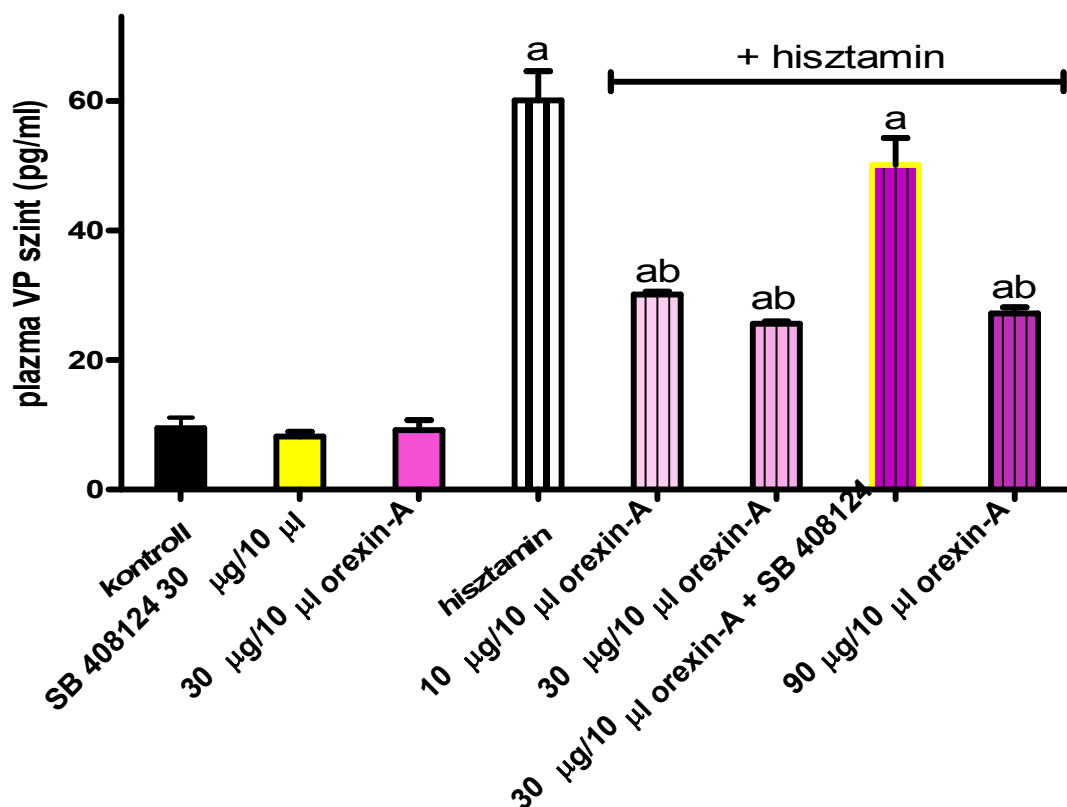
Eredmények

A plazma bazális VP szintjét nem változtatta az orexin-A-val való kezelés, egymagában adagolva az antagonistát is a kontroll értéken maradt. Várakozásainknak megfelelően a hiperozmotikus sóoldat beadását követően jelentősen fokozódott a plazmában mért VP mennyisége. A hiperozmózt kiváltó injekciót megelőzően különböző dózisban bejuttatott orexin-A ezt a növekedést nagymértékben redukálni tudta, de még így is jóval a kontroll érték feletti VP koncentrációt mértünk. Az SB 408124 ezt a reduktív hatást kivédte (5. ábra).



**5. ábra: A plazma VP szintjének alakulása orexin-A kezelést követő i.p. hiperozmotikus sóoldat adása után patkányban. (n=12; átlag±S.E.M.;
^a: szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest; ^b: szignifikáns különbség a 2,5%-os NaCl oldattal kezelt csoporthoz képest; p<0,05)**

A hisztaminnal kiváltott VP szint emelkedés jóval a hiperozmotikus kezelést követő értéket mutatta. Orexin-A-val való előkezelés ebben az esetben is csökkentette a megemelt VP szintet, de a kontrollhoz képest jóval magasabb értéken maradt. Az SB 408124 alkalmazása az orexinnel kiváltott VP szint csökkenést gátolta (6. ábra).



6. ábra: Orexin-A kezelés hatása hisztamin adagolást követő plazma VP szintre.

(n=12; átlag±S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva;

^b: szignifikáns különbség a hisztaminnal kezelt csoporthoz viszonyítva; p<0,05)

4.4. *In vivo* eredmények megbeszélése

Az orexinek szerepének vizsgálatával a szakirodalomban számos publikáció foglalkozik. Ezek közül is legnagyobb számban az alvás-ébrenlét és étvágyfokozó hatásának kapcsán születtek tudományos közlemények.

A disszertációban bemutatott *in vivo* kísérletekkel igazoltuk, hogy az orexin centrális adagolását követően jelentős mértékben fokozza a táplálékfelvételt patkányokban. Ezen eredményeink a szakirodalomban leírtaknak (64, 92) megfelelnek, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az étvágy fokozásában, a táplálkozási viselkedés szabályozásában az orexin számos más hypothalamikus és perifériás hormon közreműködésével vesz részt, mint például a ghrelin (93), a NPY (94, 95) és a leptin (96, 97).

Több morfológiai és funkcionális vizsgálat utal a LHA-ban termelődő orexinek vízanyagcsere szabályozásában betöltött szerepére (9, 15). Az általunk végzett kísérletekben az orexin-A jelentősen fokozta a vízfogyasztást, a 30 µg-os dózis bizonyult leghatékonyabbnak.

Bäckberg és munkatársai leírták az OX₁R-ok jelenlétét a vízháztartás szabályozásában központi szerepet játszó hypothalamikus területek neuronjain (9). OX₁R-ra szelektív antagonistá alkalmazásával végzett kísérleteink során megfigyeltük, hogy az SB 408124 semlegesítette az orexin-A hatását, ezzel alátámasztottuk feltevésünket, miszerint ezen receptorok kulcsszerepet játszanak az orexin hatásának kifejtésében.

Eredményeinket a szakirodalmi adatokkal összevetve megállapítható, hogy a LHA-ban termelődő orexin fiziológiás regulátorként részt vesz a vízfelvétel szabályozásában, a vízfogyasztást centrális adagolást követően jelentősen fokozza.

Az orexin a táplálékfelvétel és az étvágyfokozás szabályozását a ghrelin-NPY útvonal szoros közreműködésével fejt ki (98-100). A ghrelin étvágyfokozó hatását befolyásolja a NPY (101, 102). Mind a NPY, mind a ghrelin fokozzák a VP kiválasztást *in vivo* körülmények között (103-107). Az orexin-A centrálisan adagolva nyúlban számos más hatása mellett megnöveli a vér VP tartalmát (108) és a VP mRNS mennyiségét a PVN területén patkányokban (109). Ismeretes, hogy a dehidratáció fokozott aktivitáshoz vezet állatokban (110, 111). Transzgenikus egereken folytatott kísérletekkel igazolták, hogy az orexin neuronok V_{1a} receptor közreműködésével történő aktiválása szerepet játszik a vízmegvonással járó hiperlokomotoros aktivitásban (112). Ozmotikus stimulus aktiválja a SON (113) és PVN neuronjait (114, 115), fokozott VP és oxytocin kiválasztást eredményezve a hypothalamikus magokból. Tsunematsu és munkatársai igazolták, hogy a cerebrospinális folyadék (CSF) VP és oxytocin tartalma humorális úton, a V_{1a} receptorokon keresztül aktiválja az orexin neuronokat és az ezzel kiváltott fokozott aktivitás hozzásegíti az állatot az éhezés és szomjazás során a túléléshez (112).

Kísérleteink során a plazma bazális VP szintjét az orexin i.c.v. injektálása nem növelte meg. Ozmotikus inger, azaz 2,5%-os NaCl oldat és nem-ozmotikus inger, hisztamin i.p. adagolást követően jelentősen megemelkedett a plazma VP szintje. Ez a megfigyelés összhangban van a témában már megjelent közleményekben leírtakkal (57, 116). Az orexin-A-val történő előkezelés ezt az emelkedést mérsékelte, ezt a hatást a specifikus OX_1R antagonistá kivédett.

4.5. Következtetések

Vizsgálataink eredményeink arra utalnak, hogy az orexin okozta polydipsia kiváltásában nemcsak a szomjúság központ („drinking behaviour”), hanem a hypothalamo-neurohypophysealis rendszer is szerepet játszhat.

Megfigyeléseink alapján továbbá azt is megállapíthatjuk, hogy az orexin hatása a vízfelvételre a VP kiválasztás szabályozásában az OX₁R-ok közreműködésével is érvényesül.

Az orexinerg rendszer VP szekrécióra gyakorolt hatásának pontosabb megismeréséhez további vizsgálatokat tartottunk szükségesnek, ezeket *in vitro* sejt kultúrákon végeztük.

5. *In vitro* vizsgálatok

Bevezetés

A szakirodalom főként hypothalamikus szinten vizsgálja a VP kiválasztás szabályozását (117, 118). Ozmotikus stimulus által kiváltott VP-release vizsgálatokat izolált hypothalamo-neurohypophysealis kultúrák végeztek (119). A NH sejtek aktív szerepét a pituicyták sejtmembránján lévő neuropeptid receptorok jelenlétével igazolták (22). Munkatársaim ezt megelőzően VP kiválasztás szabályozására irányuló vizsgálatokat több ízben végeztek NH sejten. Igazolták monoaminok VP termelésre kifejtett stimuláló hatását *in vitro* körülmények között NH sejt-kultúrákban (48-50, 120). Ezen vegyületek a NH-re gyakorolt hatásának további bizonyítékai is vannak. Lemay és munkatársai 5-HT által kiváltott VP kiválasztás fokozódását írták le NH sejten (121), míg Lovino és munkatársai patkányokban találtak fokozott VP release-t 5-HT hatására (122). Pergola és munkatársai a plazma VP szintjének gyors emelkedéséről számoltak be 5-HT i.c.v. adagolása után (123). A dopaminerg rendszer VP kiválasztás szabályozásában betöltött szerepének morfológiai és funkcionális bizonyítékai vannak (42, 43, 124). Az adrenerg rendszer VP kiválasztást befolyásoló hatásának vizsgálatát számos publikáció tárgyalja. Az ADR és NADR i.c.v. adagolása serkentőleg hat a VP kiválasztásra (46, 47), stimulálja a PVN és SON neuronjait (125, 126) és i.c.v. adagolva fokozza VP mRNS szintézisét (127). A HA VP szekréciót fokozó hatását irodalmi adatok mellett (85, 87, 88) *in vivo* körülmények között végzett kísérleteink eredményei is alátámasztják. A szakirodalomban többek között munkatársaim is

beszámoltak a HA-erg rendszer hypothalamustól független, a NH-t direkt módon befolyásoló VP kiválasztást fokozó hatásáról (128-130).

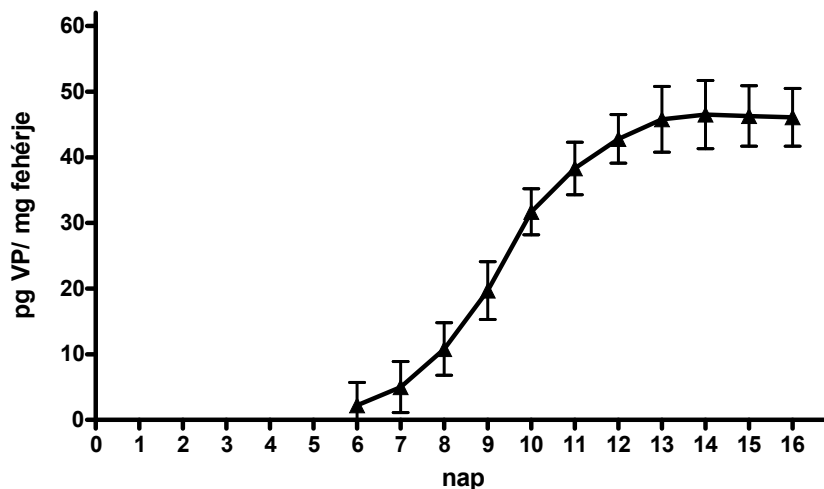
Az orexin jelentős szerepet játszik a folyadékháztartás szabályozásában (9, 15), ezt az előzőekben ismertetett eredményeink is igazolják. Az orexin receptorok mRNS-ének termelődését disznó (131), birka (132) és patkány (133) hypophysisben egyaránt kimutatták. Az értekezésben feldolgozott *in vitro* kísérletsorozatok alapja, hogy az orexin feltehetően részt vesz a NH VP kiválasztásának szabályozásában.

Izolált NH sejtenyészeten vizsgáltuk az 5-HT, a DA, a HA és az adrenerg vegyületek (ADR, NADR) hatását a VP szekrécióra. Megnéztük, hogy változik-e a sejtenyészet VP tartalma különböző dózisban történő orexin-A és orexin-B kezelést követően. Tanulmányozni kívántuk, hogyan befolyásolja a monoaminerg indukciót követő megnövekedett VP kiválasztást az orexin-A-val és orexin-B-vel való pre-, illetve posztinkubáció, illetve az SB 408124 OX₁R-ra szelektív antagonistá blokkolja-e az orexin-A esetleges hatását.

Anyagok és módszer

Az izolált NH sejtenyészeten végzett kísérleteinket a 3.2. pontban leírtaknak megfelelően végeztük.

A hormon szekréciós vizsgálatokat az előzetes megfigyelésekre alapozva a 13-14 napos sejtenyészeten végeztük (**7. ábra**).



7. ábra: VP szekréció alakulása izolált NH sejtenyészetben az eltelt napok függvényében. (n=10; átlag±S.E.M.)

A **7. ábrán** látható, hogy a felülúszó médium VP tartalma a 6. naptól éri el a mérhető mennyiséget és a 13-14. napig folyamatos növekedést mutat majd ott elérve maximumát konstanssá válik.

Az orexin-A-val és orexin-B-vel folytatott kezeléseket 10^{-10} - 10^{-4} M koncentrációk hozzáadásával végeztük, a felülúszóból 1 óra elteltével vettünk mintát VP tartalmának meghatározásához.

A monoaminergekkel való interakciós vizsgálatokhoz minden anyagot - korábbi kísérleteinkre alapozva - 10^{-6} M koncentrációban alkalmaztunk, (49, 50, 120). A pre- és posztinkubációs időtartam egyaránt 60 perces volt.

Az aspecifikus ozmotikus ingert jelentő K^+ -t 30 mM koncentrációban 1 órás inkubációval alkalmaztuk és orexin- K^+ interakció vizsgálatát 20 perces orexin (10^{-6} M) előinkubáció után végeztük.

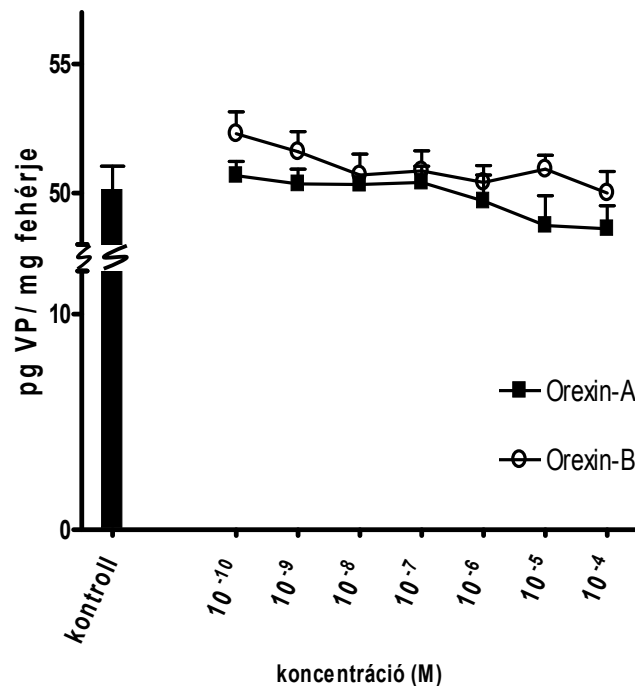
Az alább felsorolt monoaminerg vegyületekkel kezeltük a monolayer sejttenyészeteket:

1. HA (Sigma, Németország)
2. DA (Hoffman-La Roche, Svájc)
3. 5-HT (Sigma, Németország)
4. ADR (Sigma, Németország)
5. NADR (Sigma, Németország)
6. orexin-A és orexin-B (SZTE ÁOK Orvos Vegytani Tanszék, Prof. Tóth Gábor)
7. SB 408124 (Sigma, Németország)

***In vitro* vizsgálatok eredményei**

5.1. Orexin-A és orexin-B kezelés hatása a VP kiválasztásra

Az pituicyták VP kiválasztására gyakorolt hatásának vizsgálatához az orexin-A-t és orexin-B-t különböző koncentrációkban (10^{-10} - 10^{-4} M) adagoltuk a sejtenyészetekhez és egy óra elteltével mértük a felülúszó médium VP koncentrációját.

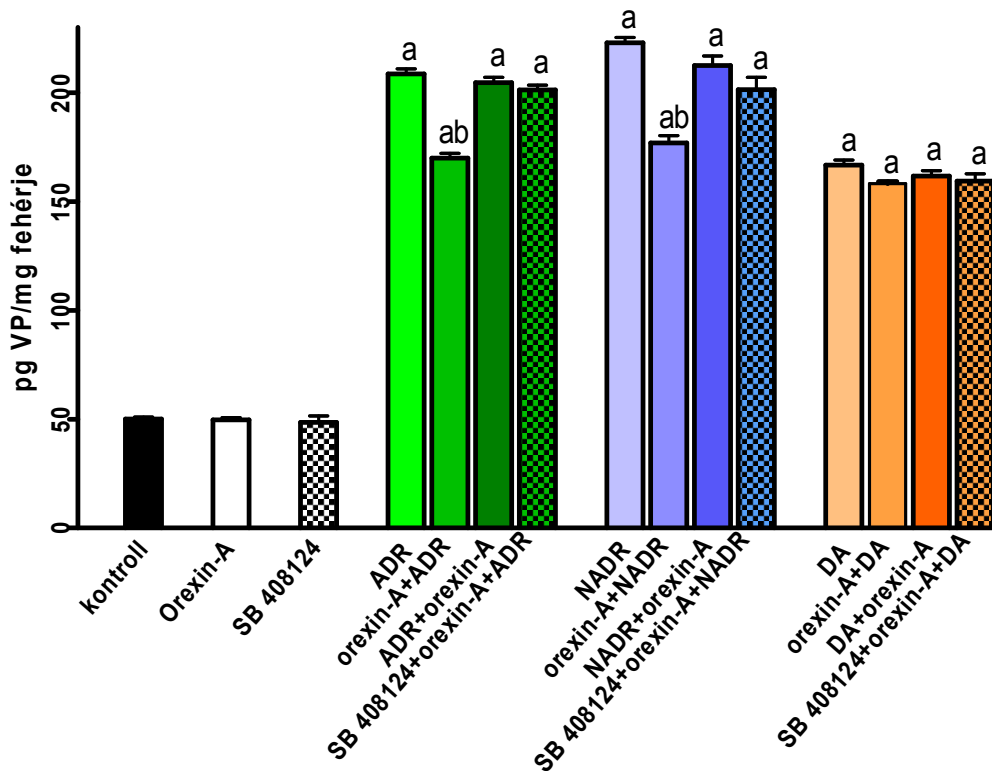


8. ábra: Orexin-A és orexin-B dóziszfüggő hatásának vizsgálata a 14 napos sejtkultúra VP szekréciójára (n= 10; átlag±S.E.M.)

A **8. ábrán** demonstrált eredmények mutatják, hogy sem az orexin-A sem az orexin-B nem okozott számottevő változást a VP release-ben a kontroll értékhez képest.

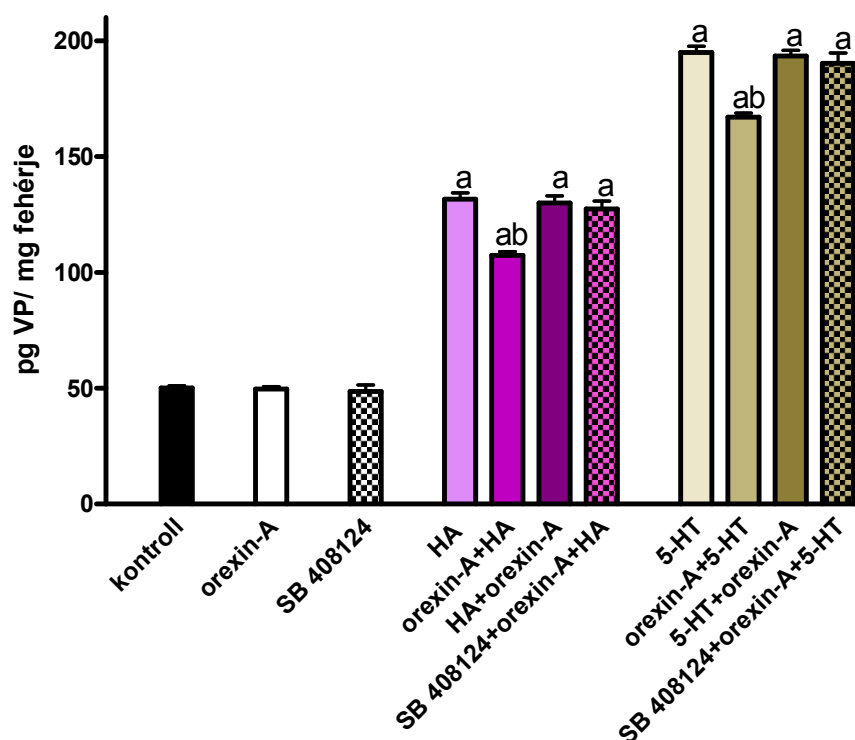
5.2. Monoaminerg indukciót követő VP szint változások orexin-A-val történő pre- és posztinkubációt követően

A **9. ábra** catekolaminokkal való interakció eredményeit mutatja be orexin-A-val történt pre- és posztinkubációt követően. A várakozásainknak megfelelően ADR, NADR és DA kezelés után a VP koncentráció minden esetben szignifikánsan megemelkedett. Orexin-A-val való preinkubáció mérsékelte a VP szekréciót ADR és NADR indukciót követően, de a csökkenés ellenére is a VP koncentráció értéke jóval a kontroll felett maradt. DA esetében ilyen redukív hatást nem észleltünk, éppúgy, mint amikor a catekolaminok adását követően alkalmaztuk az orexin-A kezelést. A specifikus OX₁R antagonistá egyben nem módosította a VP szekréciót, de orexin-A-val való szimultán adagolása a catekolamin kezelést megelőzően kivédte az orexin-A redukáló hatását. Ez újabb bizonyíték az orexin receptor VP kiválasztás regulációjában betöltött szerepére.



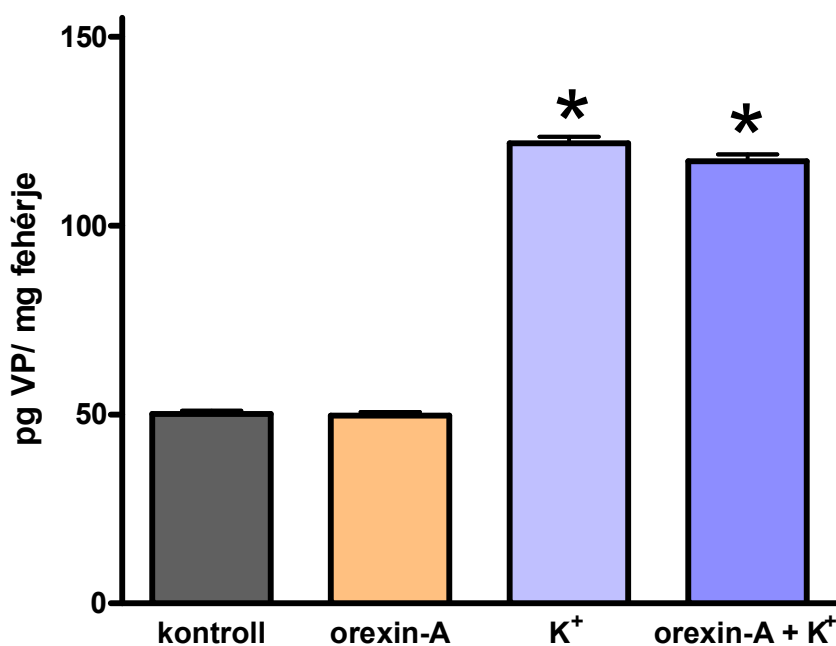
9. ábra: Katekolaminok (ADR, NADR és DA) és orexin-A interakciójának, valamint az OX_1R -ra szelektív antagonisták blokkoló hatásának vizsgálata pre- és posztinkubációt követően izolált patkány NH sejtkultúrában. (n= 10; átlag±S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; ^b: szignifikáns különbség a katekolaminnal kezelt átlaghoz képest; p<0,05)

HA-nal és 5-HT-nal kezelt sejtkultúrák felülszó médiumaiban is szignifikánsan megemelkedett a VP koncentráció, amely orexin-A-val való preinkubációval redukálható volt, míg - az előzőekben tapasztaltaknak megfelelően - az utólagos orexin kezelés nem eredményezett csökkenést. Az SB 408124 alkalmazása mindkét esetben kivédte az inhibitor hatást (**10. ábra**).



10. ábra: HA és 5-HT és orexin-A interakciójának, valamint az OX₁R-ra szelektív antagonisták blokkoló hatásának vizsgálata pre- és posztinkubációt követően izolált patkány NH sejtkultúrában. (n= 10; átlag±S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; ^b: szignifikáns különbség a HA-nal vagy 5-HT-nal kezelthez képest; p<0,05)

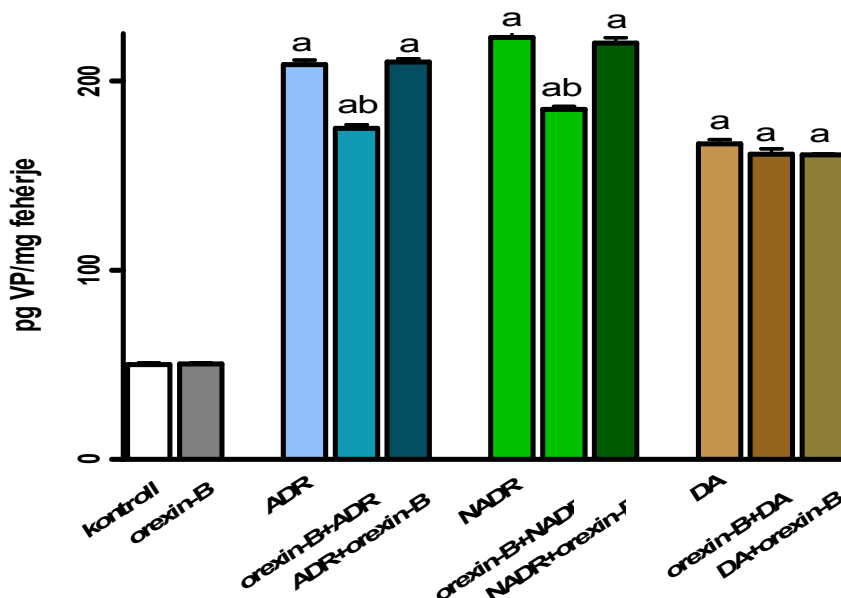
Aspecifikus ozmotikus inger hatását és ennek orexin-A-val való befolyásolásának vizsgálatát a **11. ábra** mutatja. K^+ -ot adtunk a felülúszó médiumhoz és jelentős VP kiválasztás fokozódást észleltünk. K^+ adagolást megelőző orexin-A kezelés nem befolyásolta a VP szekréció mértékét.



11.ábra: Aspecifikus inger (K^+ adagolás) hatása a VP kiválasztásra és változása orexin-A preinkubációt követően. (n= 10; átlag±S.E.M.; *: szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva; $p<0,05$)

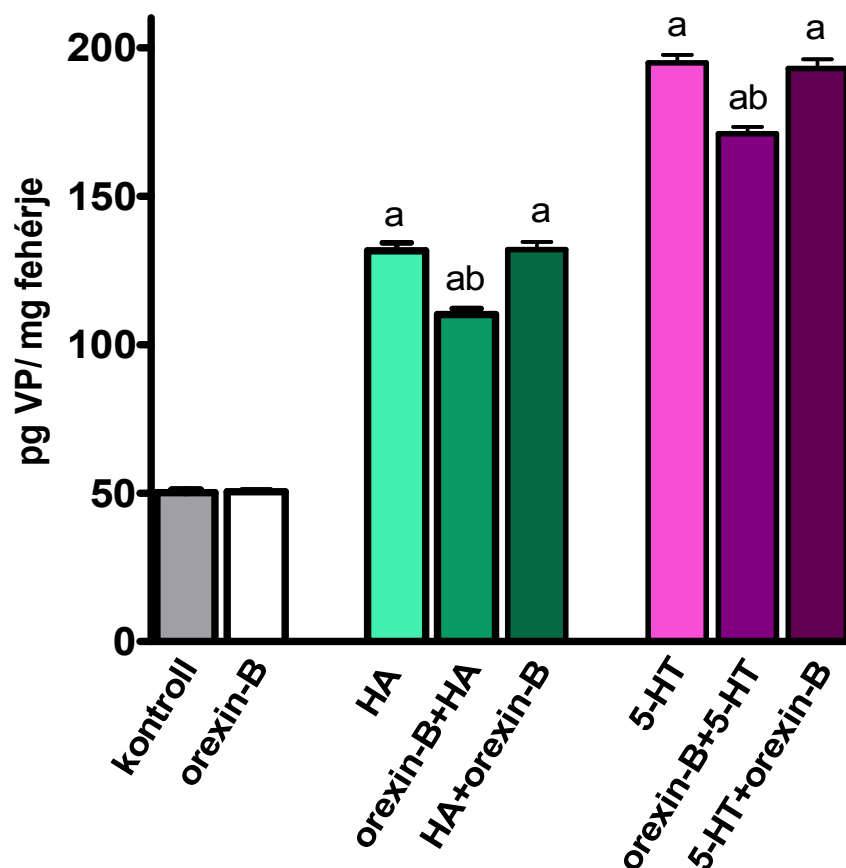
5.3. Monoaminerg indukciót követő VP szint változások orexin-B-vel történő pre- és posztinkubációt követően

In vitro kísérleteink során vizsgáltuk az orexin-B hatására bekövetkező változásokat a NH sejt kultúrák felülúszó médiumainak VP koncentrációjának függvényében. Orexin-B hatására nem változott a VP koncentrációja a kontroll médiumok felülúszójában mérthez képest. A **12. ábrán** látható eredmények azt mutatják, hogy az orexin-B-vel történő előkezelés visszaszorította az ADR és NADR által kiváltott VP termelés fokozódását, míg DA esetében nem tapasztaltunk ilyen mérséklést. Utólagos kezelés orexin-B esetében nem okozott az előkezeléshez hasonló redukáló hatást.



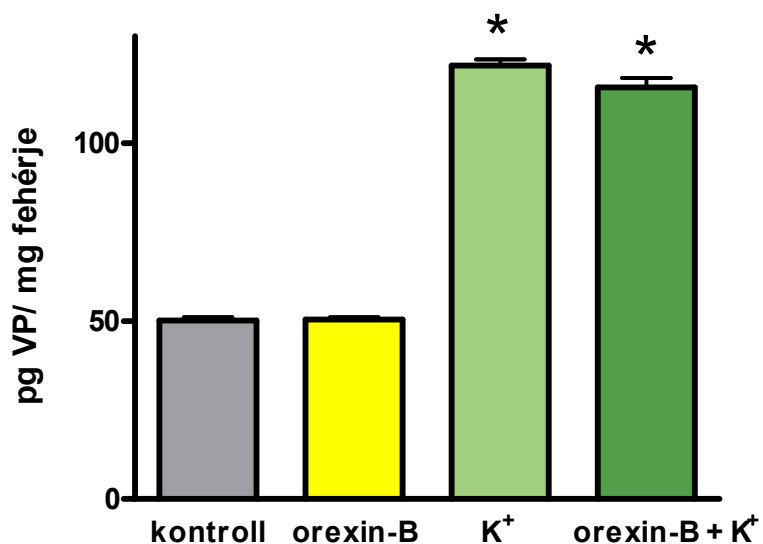
12. ábra: Monoaminok (ADR, NADR és DA) és orexin-B interakciójának vizsgálata pre- és posztinkubációt követően izolált patkány NH sejt kultúrában. (n= 10; átlag±S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; ^b: szignifikáns különbség a catecholaminnal kezeltéhez képest; p<0,05)

Csakúgy, mint az előzőekben, 5-HT és HA kezelés hatására fokozódott a VP koncentráció a sejtenyészet felülúszó médiumában. Ez az emelkedés orexin-B előkezeléssel csökkenthető volt, utólagos orexin-B adása a megnövelt VP koncentrációt nem befolyásolta (13. ábra).



13.ábra: HA és 5-HT interakciójának vizsgálata orexin-B-vel izolált patkány NH sejtenyészet felülúszó médiumának VP szint kiválasztásában (n= 10; átlag±S.E.M.; ^a: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; ^b: szignifikáns különbség a HA-val, illetve 5-HT-val kezeltéhez képest; p<0,05)

A K^+ -mal kiváltott fokozott hormon kiválasztást az orexin-B preinkubáció egyáltalán nem befolyásolta, ezt az eredményt a **14. ábra** mutatja.



14. ábra: Aspecifikus inger (K^+ adagolás) hatása a VP kiválasztásra és változása orexin-B preinkubációt követően. (n= 10; átlag±S.E.M.; *: szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; $p<0,05$)

5.4. *In vitro* eredmények megbeszélése

Az értekezés első részében leírt *in vivo* kísérleteket *in vitro* vizsgálatokkal egészítettük ki, melyek célja az orexineknek a VP kiválasztás NH szintjén történő szabályozásában és ezzel a folyadékháztartásban betöltött szerepének tisztázása.

Módszereink korábbi megfigyelésekre alapoztuk. Sejtenyészetekben végzett vizsgálatainkhoz izolált patkány NH sejt kultúra VP-t termelő képességét vettük alapul, melyet témavezetőm és munkatársai igazoltak (24). Más munkacsoportok VP és mRNS-ének jelenlétét mutatták ki a neurohypophysisben (134) és adenohypophysisben is (135, 136). Kísérleteink további alapját képezi az agy monoamin vegyületeinek VP kiválasztásra gyakorolt serkentő hatásának ismerete (48-50, 120).

Orexin receptorok mRNS-ének jelenlétét qRT-PCR, WB és ISH módszerekkel analizálták perifériás szövetekben és az agy számos területén is (131, 137, 138). A hypophysisben mindkét receptor jelenlétét kimutatták patkányban (74, 132, 139) és emberben is (140). A receptorok jelenléte a hypophysisben feltételezi az orexinek szabályozó funkcióját.

Első kísérletsorozatunkban megfigyeltük, hogy sem orexin-A-val, sem orexin-B-vel való kezelés a NH sejtenyészet bazális VP kiválasztását nem befolyásolja.

Ezt követően monoaminok adagolásával fokozott VP szekrécióra kifejtett hatásukat néztük meg és tanulmányoztuk hogyan befolyásolják a VP kiválasztás növekedését, vizsgáltuk továbbá orexin-A esetében az OX₁R-ra szelektív antagonistá alkalmazásával megfigyelhető változást.

Vannak adatok a monoaminerg-kolinerg rendszer és az orexinek interakciójára (141), valamint, hogy az orexin neuronok monoaminerg receptorokat tartalmaznak (142-145).

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal bizonyították orexin neuronok axon végződéseit locus coeruleus és nucleus tractus solitarii noradrenerg és adrenerg sejtein (146), szinaptikus aktivitásukkal igazolták funkcionális kapcsolatukat (147, 148). A dopaminerg és orexinerg rendszer kapcsolatával többen is foglalkoztak (149, 150), megállapították, hogy az orexinek által kiváltott hiperlokomotoros aktivitás - amennyiben szomjazás miatt alakult ki - a dopaminerg rendszer közreműködésével jön létre (151). Tsunematsu szerint a megnövekedett VP szintnek is jelentősége van; ez a szabályozás az orexin neuronokon levő V_{1a} receptorain keresztül érvényesül (112). Megfigyelték, hogy az 5-HT neuronok direkt és indirekt orexin szabályozás alatt állnak (152), mind az orexin-A, mind az orexin-B a hisztaminerg rendszeren keresztül vesz részt az ébrenlét hypothalamikus szinten történő szabályozásában (153), mindkét neuropeptid depolarizálja a hisztaminerg neuronokat (8).

VP kiválasztást serkentő hatásukban feltehetően receptoraik közreműködésével vesznek részt. Mintegy 9 adrenerg receptor típust (154), 2 DA receptor családot (155) és 4 HA receptor típust azonosítottak (H_{1-4}) (156), míg az 5-HT-nak 15 különböző receptorát 3 csoportba sorolják (157). Munkatársaimnak NH sejtenyészeten antagonistákkal végzett korábbi megfigyelései összhangban más szakirodalmi adatokkal alátámasztják, hogy a dopaminerg D_1 és D_2 (158), az adrenerg α_1 és β_2 (159, 160), a serotonerg $5-HT_2$ (161) és a hisztaminerg H_1 és H_2 (162) receptorok vesznek részt a VP szekréció NH szintjén történő szabályozásában.

VP kiválasztásának fokozódását tapasztaltuk monoaminokkal való kezelést követően a sejtenyészet felülúszó médiumában. Orexinnel a fokozott termelés csökkenthető volt, de csak akkor, ha az orexin inkubáció megelőzte a monoamin kezelést. Az általunk sejtenyészeteken végzett kísérletek során az orexin-A és orexin-B hatása között

számottevő különbséget nem detektáltunk, ezzel szemben számos közleményben az orexin-B kisebb hatékonyságát mutatták ki (10, 16, 65). Az előkezelés hatékonyságát az utólagos kezelés hatásának elmaradásával korábban munkatársaim megfigyelték egy másik hypothalamikus hormon, a galaninnal történt vizsgálataik során is és igazolták, hogy a galanin, mint peptid modulátor, részt vesz a VP kiválasztás szabályozásában NH szintjén is (116, 163). Antagonistákkal végzett kísérletekre alapozták annak magyarázatát, hogy míg az előkezelés hatásos, az utólagos neuropeptid adagolás nem eredményez csökkentett VP kiválasztást. E szerint elképzelhető, hogy a receptorok deszenzitizálódnak, vagyis telítődésük miatt az antagonistákra nem reagálnak és így elmarad a VP szint csökkenése. Ebben az esetben a monoaminokkal történt kezelés során a pituicyták veszítenek szenzitivitásukból és így az orexin kezelésre már nem reagálnak. Másrészt magyarázat lehet az, hogy az inkubációs idő (60 perc) elegendő a monoaminok VP szintet fokozó hatásának maximális eléréséhez, így az azt követő orexines kezelés már hatástalan.

Az orexinnek 2 G-fehérjéhez kapcsolt receptora ismert (OX_1R és OX_2R) (164-167), a hypophysis területén az OX_1R -ok nagyobb számban vannak jelen, mint az OX_2R -ok (133). Az OX_1R VP kiválasztásban és monoaminerg-interakcióban való részvételének igazolására specifikus antagonistával (SB 408124) (168) végeztünk vizsgálatot. Az SB 408124 alkalmazásával a monoaminergekkel indukált VP szint emelkedés csökkenthető volt. Ez a megfigyelés bizonyítékul szolgál az OX_1R -ok jelentőségére a hypophysis hormon kiválasztásának regulációjában. Támogatja ezt a hipotézist a nem specifikus ozmotikus ingerként alkalmazott K^+ adagolásával kiváltott, receptoroktól független hormonkiválasztás, ennek eredményeként nem észleltünk különbséget az orexinnel kezelt és a kontroll csoportok összehasonlítása során.

5.5 Következtetések

Vizsgálataink eredményeként megállapítható, hogy az orexin vízanyagcsere hatását nemcsak a hypothalamo-hypophyseális rendszer szintjén fejt ki, hanem a sejt kultúrában tenyésztett NH sejtek (pituicyták) VP kiválasztását is befolyásolja. *In vitro* kísérleteink megerősítették az élő állatban tett megfigyeléseinket: 1. Az orexin VP szekréció regulálásában betöltött szerepét a monoaminerg rendszerrel való interakcióján keresztül érvényesíti; 2. A VP kiválasztás szabályozását az orexin az OX₁R-ok közreműködésével fejt ki.

Összefoglalás

Kutatásaink során az orexin neuropeptidek hatását vizsgáltuk a vízyangcserére és a vazopresszin (VP) kiválasztásra *in vivo* és *in vitro* körülmények között.

In vivo kísérleteinkben egyrészt igazoltuk az irodalomban is leírt intracerebroventrikulárisan (i.c.v.) adagolt orexineknek táplálékfelvételt-fokozó hatását. Eredményeink alapján az orexin-A hatékonyabbnak bizonyult az orexin-B-hez viszonyítva. Intraperitoneális (i.p.) adagolást követően nem tapasztaltunk változást, amely szintén megegyezik az irodalmi adatokkal, így a későbbiekben ettől a kezelési módtól el is tekintettünk.

Az orexinek vízyangcserére gyakorolt hatásának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a centrálisan, különböző koncentrációban (10-30-90µg/10µl) beadott orexin-A jelentős mértékben fokozta a vízfelvételt. Orexin-B kezeléssel is tapasztaltunk fokozott vízfelvételt, de a vízfogyasztás jóval az orexin-A-val történt kezelést követő szint alatt maradt. A dózis-hatás összefüggést tanulmányozva megállapítottuk, hogy az orexin adagjának növelésével a vízfogyasztás nem fokozódik lineáris mértékben. Az alkalmazott dózisok közül a 30µg/10µl-es orexin-A koncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak. Az utóbbi mennyiségben alkalmazva tanulmányoztuk az orexin-A receptor (OX₁R) specifikus antagonistájának szerepét a patkányok orexin-A-val indukált vízfelvételére. Az önmagában alkalmazott antagonista nem váltott ki fokozó hatást, míg azonos koncentrációban (30µg/10µl) szimultán i.c.v. adagolva orexin-A-val, a vízfelvétel jóval az orexin-A injekciót követő emelkedett szint alatt maradt.

Centrális orexin adagolást követően a plazma bazális VP szintje nem emelkedett. Ozmotikus inger (i.p. 2,5% NaCl) hatására fellépő VP szint emelkedést az i.c.v. orexin előzetes adagolása mérsékelte, antagonistá együttes alkalmazásával ez a redukció kivédhető volt. A hisztaminnal (HA) előidézett nem ozmotikus inger jelentősen emelte a bazális VP szintet, ez az emelkedés előzetesen adagolt orexinnel kisebb értéket mutatott, az antagonistá a csökkenést ebben az esetben is gátolta. Ezen eredményeink alátámasztják az orexin szerepét a vízanyagcsere szabályozásában a hypothalamo-neurohypophysealis rendszerben. A specifikus receptor antagonistával történt vizsgálataink arra utalnak, hogy ebben a szabályozásban az OX₁R-nak fontos szerepe van.

A vízanyagcserére vonatkozó kísérleteinket kiegészítettük *in vitro* vizsgálatokkal. Tanulmányoztuk, hogy izolált NH sejt kultúrában az orexin képes-e befolyásolni a VP kiválasztást. Témavezetőm, Prof. László A. Ferenc és munkatársai korábban igazolták az agy monoaminerg vegyületeinek VP kiválasztást fokozó hatását Dr. Gálfi Márta tanárnő által korábban kidolgozott és publikált módszerrel előállított NH sejt kultúrában. A felülúszó médiumból RIA módszerrel határoztuk meg a VP mennyiségét. Megállapítottuk, hogy a sejt kultúrában a VP kiválasztás az inkubáció elindítását követő 5-6. napon indul meg és folyamatos növekedést mutat, a 13-14. napon maximumára nő, ezt követően a VP szint nem változik. Vizsgálatainkhoz 14 napos szövetkultúrákat alkalmaztunk.

A sejt kultúrában az orexin-A és -B dózisainak növelésével (10^{-10} - 10^{-4} M) a kontroll VP szintjéhez viszonyítva a felülúszó médiumokban szignifikáns változás nem volt kimutatható. Megállapítottuk, hogy – a kutatócsoport korábbi megfigyelését alátámasztva – a monoaminerg vegyületek (HA, DA, ADR, NADR, 5-HT) hatására

jelentős VP szint emelkedés jött létre. A monoaminerg indukciót megelőző orexin preinkubáció a két neuropeptid típus esetében egyöntetűen csökkentette az emelkedett VP szintet HA, ADR, NADR és 5-HT kezelést követően. DA adagolás után szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A csökkenés az orexin-A-val folytatott kísérletsorozatban a már említett OX₁R antagonistá adásával kivédhető volt.

A monoaminerg vegyületekkel történő inkubációt követő orexin kezelés nem okozott változást a megemelkedett VP szintben.

A sejtenyészetben aspecifikus ozmotikus inger hatására, melyet K⁺ adagolásával váltottunk ki, jelentős VP kiválasztás fokozódást észleltünk, a VP szekréciót ebben az esetben nem befolyásolta az orexinnel való előzetes inkubáció. A K⁺ hormonszekréciót fokozó hatása nem receptorhoz kötött és az antagonistával tapasztalt védő hatásból arra következtethetünk, hogy az orexin VP kiválasztás szabályozásában betöltött szerepét a specifikus receptorai közreműködésével fejt ki.

Kutatásaink eredményeiből arra is következtethetünk, hogy a VP termelés regulációja és az orexin-monoaminerg interakció a hypophysis hátsólebeny szintjén is érvényesül.

Summary

The effects of the orexin neuropeptides on water intake and VP secretion were investigated using *in vivo* and *in vitro* experiments.

The effects of the centrally administered orexin-A and -B on water intake and VP secretion were studied in male Wistar rats in our *in vivo* experiments. Our present findings showed that food intake can be enhanced by the 33 amino-acid-containing orexin-A and the 28 amino-acid-containing orexin-B. A number of data have demonstrated that water consumption increased significantly following the i.c.v. administration of either orexin-A or orexin-B in a dose-dependent manner. The highest elevation was detected at the 30 µg/ 10 µl concentration. To reveal the manner in which the orexins possibly influence drinking behaviour, we carried out examinations with a selective OX₁R antagonist. We observed that the specific antagonist itself did not cause any changes in water consumption, but when coadministered with orexin-A, the orexin-A-induced increase was considerably reduced, but the water intake still remained significantly higher as compared with the controls.

One other aim of our *in vivo* was to investigate whether the orexins can modulate drinking behaviour through influencing the VP secretion from the NH. Hyperosmotic stimulation (i.p. administration of either HA or 2.5% NaCl) enhanced the basal VP level in blood, i.p. HA injection increased plasma VP concentration to a much higher level than that following the hyperosmotic NaCl injection, but following the preinjection of orexin-A or orexin-B, the VP level increases were more moderate in both cases. The highest effect was observed for the 30 µg/ 10 µl orexin-A dose, but the VP level was not

as low as that of the control. At the most effective dosage (30 µg/ 10 µl), treatment with the specific OX₁R antagonist SB 408124 together with orexin-A after i.p. HA or hyperosmotic NaCl stimulation prevented the reduction in VP level increase.

According to our *in vivo* results - concordant to the relevant scientific publications -, we establish that orexins administered i.c.v. cause enhanced food intake, act on the water metabolism and play a physiological role in the regulation of water consumption through the 1-type orexin receptor.

As VP exerts a significant influence on the regulation of water metabolism, we examined *in vitro* whether orexins modify the secretion of VP in NH cell cultures. We earlier found that monoaminergic compounds, such as ADR, NADR, HA, DA and 5-HT, can increase VP secretion in NH cell cultures, and we therefore studied whether orexins influence this action of monoaminergic compounds. Using the method of Dr. Márta Gálfi, we could make pituicyte cultures from rat NH, capable of VP production and secretion. The VP content of the supernatant medium was determined on day 5 or 6, and gradually increased up to day 13 or 14, by this time the hormone secretion had become constant. We used these cultures for our *in vitro* experiments. The dose-effect relationship between orexin-A and orexin-B and VP secretion were investigated following the administration of 10⁻¹⁰-10⁻⁴ M orexins. In these experiments, noteworthy changes were not observed in the VP concentrations of the cell culture media. Preincubation with orexin-A (10⁻⁶ M) or orexin-B (10⁻⁶ M) reduced the ADR, NADR, HA and 5-HT-induced VP level increase, but the VP concentrations of the supernatant media remained above the control level. After DA administration, orexin treatment proved to be ineffective. If the monoaminergic compound treatment precedes the application of the orexins, neither orexin-A, nor orexin-B induced changes in the enhanced VP release, which can be

explain in that a 60-min period is probably long enough for the VP level-increasing action of monoaminergic compounds to be exerted and orexins have therefore no effect. There were no substantial differences in decreasing effect between orexin-A or orexin-B. To confirm the role of the orexin receptors in the regulation of the hypophyseal VP secretion, selective OX₁ receptor antagonist, SB 408124 were used in our experiments and resulted that the antagonist prevented the orexin-A-induced VP reduction effect in each case.

In the last experimental phase, we examined the effects of non-osmotic stimuli on VP secretion in isolated NH cell cultures. Significantly elevated VP levels were measured after K⁺ administration. The increase of VP secretion did not changed by orexin treatments. The enhancing effect of K⁺ on hormone secretion is not dependent on the receptors, and we therefore concluded that orexin receptors on the membrane of the pituicytes of the isolated cell cultures are involved in the interactions between the monoaminergic and orexinergic system.

In conclusions, our present results show that orexins stimulate food intake and can cause polydipsia, acting on the water consumption through the orexin receptors and the orexinergic interactions also occur at the level of the posterior pituitary, and the OX₁Rs are involved in the regulation of the water metabolism.

Zárszó

Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a nemrégiben izolált két orexin neuropeptid *in vivo* és *in vitro* körülmények között szerepet játszhat a VP kiválasztás regulációjában. Az *in vitro* kísérletek továbbá alátámasztják a hipotézist, miszerint az interakciójuk monoaminergekkel a hypothalamustól függetlenül, a hypophysis szintjén is érvényesül. Az antagonistával kapott eredményeink arra utalnak, hogy az orexinek regulátor funkciója a specifikus receptoraikon keresztül érvényesül.

Kísérleteink elsősorban elméleti jelentőségűek: A centrális szabályozás szempontjából fontos orexinnek a vízanyagcserére gyakorolt hatásának tisztázásához kívánunk hozzájárulni.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet témavezetőimnek. Prof. László Ferencnek, aki munkám során nagy szakértelemmel és türelemmel támogatott, és akinek hite és szeretete a tudományban egy életre példaként marad meg bennem. Dr. Varga Csabának a sok szakmai és emberi segítséget, azt, hogy mindig pozitívan állt az előttünk álló feladatok megoldásához. Ifj. Prof. László Ferencnek a kutatásaim során nyújtott segítségével, tisztelettel emlékezve rá. Dr. Molnár H. Andornak mind a módszerek gyakorlati elsajátításában, mind az elméleti kérdések megválaszolásában nyújtott segítségével és türelméért.

Köszönettel tartozom Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén végezhessem munkámat és tagja lehettem a tanszék közösségének.

Hálás vagyok Dr. Gálfi Márta tanárnőnek és munkatársainak az *in vitro* módszerek megismerésében és kivitelezésében, valamint Dr. Gardi Jánosnak és munkatársainak a VP meghatározásában nyújtott felbecsülhetetlen szakmai és elméleti segítségét.

Köszönöm Tóth Gábor professzornak és Rákosi Kingának az orexin neuropeptidek előállítását.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak: Magyariné Berkó Anikónak „a kutatómunkám során felmerült összes megoldhatatlannak tűnő metodikai probléma megoldásáért” (Dr. Molnár H. Andor nyomán), Szalai Zitának és Daruka Lejlának, valamint Szabó Renátának és Király Adélnak mind a gyakorlati feladatok elvégzésében nyújtott segítségükért, mind a jó laborhangulat megteremtéséért.

Az Élettani Tanszék valamennyi dolgozójának hálás vagyok a támogatásukért, a barátságos légkörért, amelybe befogadtak.

Családomnak, Apukámnak, Anyukámnak és testvéremnek köszönöm odaadó és feltétlen támogatását a kezdetektől.

Köszönöm Dr. Karcsú Saroltának a nem csak szakmai, de családi téren nyújtott támogatását.

Hálás vagyok barátaimnak: Ritának, Szilvinek, Lórinak, Petinek, Ancsának, SzGabornak, akik a nehéz időkben mindig lendületet adtak.

Köszönöm mindenkinek, aki a disszertációm megírásához bármilyen segítséget nyújtott.

...végül köszönöm Pepémnek és Józsikámnak a leírhatatlant, nélkülük nem sikerült volna...

Irodalomjegyzék

1. **de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG** 1998 The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-7
2. **Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M** 1998 Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-85
3. **Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R** 2006 Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 6:17-42
4. **van Dijk G, Evers SS, Guidotti S, Thornton SN, Scheurink AJ, Nyakas C** The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance. *Behav Brain Res* 221:481-7
5. **Guan JL, Saotome T, Wang QP, Funahashi H, Hori T, Tanaka S, Shioda S** 2001 Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport* 12:547-51
6. **Takahashi K, Wang QP, Guan JL, Kayama Y, Shioda S, Koyama Y** 2005 State-dependent effects of orexins on the serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. *Regul Pept* 126:43-7
7. **Wang QP, Koyama Y, Guan JL, Takahashi K, Kayama Y, Shioda S** 2005 The orexinergic synaptic innervation of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. *Regul Pept* 126:35-42
8. **Eriksson KS, Sergeev O, Brown RE, Haas HL** 2001 Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *Neuroscience* 21:9273-79
9. **Bäckberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B** 2002 Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 15:315-28
10. **Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I, Telegdy G** 2000 Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol* 12:1174-8
11. **Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T** 1999 Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 264:759-62
12. **van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB** 1998 Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18:7962-71
13. **Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M** 1999 Orexins, orexigenic hypothalamic

- peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748-53
14. **Sakurai T** 1999 Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* 85:25-30
 15. **Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T** 1999 Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842:256-61
 16. **Dube MG, Kalra SP, Kalra PS** 1999 Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* 842:473-7
 17. **Li MD, Parker SL, Kane JK** 2000 Regulation of feeding-associated peptides and receptors by nicotine. *Mol Neurobiol* 22:143-65
 18. **Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK** 2001 Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6-25
 19. **Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K** 1999 Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243-60
 20. **Trivedi PG, Yu H, Trumbauer M, Chen H, Van der Ploeg LH, Guan X** 2001 Differential regulation of neuropeptide Y receptors in the brains of NPY knock-out mice. *Peptides* 22:395-403
 21. **Jirikowski GF, Sanna PP, Maciejewski-Lenoir D, Bloom FE** 1992 Reversal of diabetes insipidus in Brattleboro rats: intrahypothalamic injection of vasopressin mRNA. *Science* 255:996-8
 22. **Boersma CJ, Van Leeuwen FW** 1994 Neuron-glia interactions in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neuroscience* 62:1003-20
 23. **Janaky T, Szabo P, Kele Z, Balaspiri L, Varga C, Galfi M, Vecsernyes M, Gaspar L, Juhasz A, Laszlo FA** 1998 Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:1765-8
 24. **László FA, Gálfi M, Jójárt I, Vecsernyés M, Laczi F, Maderschpach K** 1989 Neurohypophysis Tissue Culture as a Model of Hormonal Activity of Rat Pituicytes. In: *Proc 4th Int Conf Neurohypophysis, New Aspects of Morphology Function and Regulation*, Copenhagen: Oxford Univ. Press:pp. 87-91
 25. **Boersma CJ, Sonnemans MA, Van Leeuwen FW** 1993 Immunoelectron microscopic demonstration of oxytocin and vasopressin in pituicytes and in nerve terminals forming synaptoid contacts with pituicytes in the rat neural lobe. *Brain Res* 611:117-29
 26. **Murphy D, Levy A, Lightman S, Carter D** 1989 Vasopressin RNA in the neural lobe of the pituitary: dramatic accumulation in response to salt loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9002-5
 27. **Mohr E, Zhou A, Thorn NA, Richter D** 1990 Rats with physically disconnected hypothalamo-pituitary tracts no longer contain vasopressin-oxytocin gene transcripts in the posterior pituitary lobe. *FEBS Lett* 263:332-6
 28. **Pu LP, Van Leeuwen FW, Tracer HL, Sonnemans MA, Loh YP** 1995 Localization of vasopressin mRNA and immunoreactivity in pituicytes of pituitary stalk-transected rats after osmotic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10653-7

29. **Barberis C, Audigier S, Durroux T, Elands J, Schmidt A, Jard S** 1992 Pharmacology of oxytocin and vasopressin receptors in the central and peripheral nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 652:39-45
30. **Streefkerk JO, Pfaffendorf M, van Zwieten PA** 2003 Endothelium-dependent, vasopressin-induced contractions in rabbit renal arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:703-9
31. **Tribollet E** 1992 Vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain. In: Björklund, A., Hökfelt, T., Kuhar, M. J. eds., *Handbook of chemical neuroanatomy*. New York: Elsevier, 11:289-320.
32. **Antoni FA, Holmes MC, Makara GB, Kerteszi M, Laszlo FA** 1984 Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides* 5:519-22
33. **Holmes CL, Landry DW, Granton JT** 2003 Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* 7:427-34
34. **du Vigneaud V, Gash DT, Katsoyannis PG** 1954 A synthetic preparation possessing biological properties associated with arginine-vasopressin. *J Am Chem Soc* 76:4751
35. **Share L** 1988 Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* 68:1248-84
36. **Rofe AM, Williamson DH** 1983 Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J* 212:231-9
37. **Schang JC, Dapoigny M, Devroede G** 1987 Stimulation of colonic peristalsis by vasopressin: electromyographic study in normal subjects and patients with chronic idiopathic constipation. *Can J Physiol Pharmacol* 65:2137-41
38. **Wied D** 1976 Hormonal influences on motivation, learning, and memory processes. *Hosp Pract* 11:123-31
39. **Valtin H** 1984 Renal actions by which vasopressin may aid the concentration of urine. *Nephrology*, Vol. 1. (R. R. Robinson, ed.), pp. 397-406, Springer-Verlag, New York.
40. **Knigge U, Warberg J** 1991 The role of histamine in the neuroendocrine regulation of pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:609-19
41. **Knigge U, Willems E, Kjaer A, Jorgensen H, Warberg J** 1999 Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 140:3713-9
42. **Buijs RM, Geffard M, Pool CW, Hoorneman EM** 1984 The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. *Brain Res* 323:65-72
43. **Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G** 1984 Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306:19-30
44. **Falke N** 1991 Modulation of oxytocin and vasopressin release at the level of the neurohypophysis. *Prog Neurobiol* 36:465-84
45. **Reichlin S** 1998 Neuroendocrinology. In: Wilson J. D., Foster D. W., Kronenberg H. M., Larsen P.R., eds. *Textbook of Endocrinology* Philadelphia:165-248
46. **Leng G, Brown CH, Russell JA** 1999 Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. *Prog Neurobiol* 57:625-55

47. **Stone JD, Crofton JT, Share L** 1989 Sex differences in central adrenergic control of vasopressin release. *Am J Physiol* 257:R1040-5
48. **Galfi M, Janaky T, Toth R, Prohaszka G, Juhasz A, Varga C, Laszlo FA** 2001 Effects of dopamine and dopamine-active compounds on oxytocin and vasopressin production in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul Pept* 98:49-54
49. **Galfi M, Radacs M, Juhasz A, Laszlo F, Molnar A, Laszlo FA** 2005 Serotonin-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue culture. *Regul Pept* 127:225-31
50. **Radacs M, Galfi M, Nagyri G, Molnar AH, Varga C, Laszlo F, Laszlo FA** 2008 Significance of the adrenergic system in the regulation of vasopressin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul Pept* 148:1-5
51. **Paxinos G, Watson C** 1996 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press Compact Third Edition
52. **Kennedy PG, Lisak RP, Raff MC** 1980 Cell type-specific markers for human glial and neuronal cells in culture. *Lab Invest* 43:342-51
53. **Michler-Stuke A, Bottenstein JE** 1982 Proliferation of glial-derived cells in defined media. *J Neurosci Res* 7:215-28
54. **Husztai Z, Rimanoczy A, Juhasz A, Magyar K** 1990 Uptake, metabolism, and release of [3H]-histamine by glial cells in primary cultures of chicken cerebral hemispheres. *Glia* 3:159-68
55. **Julesz J, Galfi M, Molnar J, Vecsernyes M** 1992 Central effects of tricyclic compounds on the endocrine system--an in vitro study. *Prog Brain Res* 91:89-92
56. **Dogterom J, van Wimersma Greidanus TB, De Wied D** 1978 Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog, and rat. *Am J Physiol* 234:E463-7
57. **Laczi F, Ivanyi T, Julesz J, Janaky T, Laszlo FA** 1986 Plasma arginine-8-vasopressin responses to osmotic or histamine stimulation contribute to the differential diagnosis of central diabetes insipidus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 113:168-74
58. **Hunter WM, Greenwood FC** 1962 Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-6
59. **Janaky T, Tóth G, Penke B, Kovács K, Laszlo FA** 1982 Iodination of peptide hormones and purification of iodinated peptides by HPLC. *J Liq Chromatogr* 5:1499-507
60. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75
61. **Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR** 1999 The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160:R7-12
62. **Espana RA, Plahn S, Berridge CW** 2002 Circadian-dependent and circadian-independent behavioral actions of hypocretin/orexin. *Brain Res* 943:224-36
63. **Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C** 2000 Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269:41-5
64. **Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM** 1999 Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821:535-8

65. **Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR** 1999 Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-105
66. **Sartin JL, Dyer C, Matteri R, Buxton D, Buonomo F, Shores M, Baker J, Osborne JA, Braden T, Steele B** 2001 Effect of intracerebroventricular orexin-B on food intake in sheep. *J Anim Sci* 79:1573-7
67. **Oltmans GA, Harvey JA** 1976 Lateral hypothalamic syndrome in rats: a comparison of the behavioral and neurochemical effects of lesions placed in the lateral hypothalamus and nigrostriatal bundle. *J Comp Physiol Psychol* 90:1051-62
68. **Jain S, Mathur R, Sharma R, Nayar U** 1999 Neural tissue transplant in the lateral hypothalamic lesioned rats: functional recovery pattern. *Neurobiology (Bp)* 7:421-30
69. **Marshall JF, Teitelbaum P** 1974 Further analysis of sensory inattention following lateral hypothalamic damage in rats. *J Comp Physiol Psychol* 86:375-95
70. **Grossman SP** 1960 Eating or drinking elicited by direct adrenergic or cholinergic stimulation of hypothalamus. *Science* 132:301-2
71. **Mogenson GJ, Stevenson JA** 1967 Drinking induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Exp Neurol* 17:119-27
72. **Gonzalez-Lima F, Helmstetter FJ, Agudo J** 1993 Functional mapping of the rat brain during drinking behavior: a fluorodeoxyglucose study. *Physiol Behav* 54:605-12
73. **Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS** 1998 Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015
74. **Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M** 2000 Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 76:1-6
75. **Martynska L, Polkowska J, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Wasilewska-Dziubinska E, Bik W, Baranowska B** 2006 Orexin A and its role in the regulation of the hypothalamo-pituitary axes in the rat. *Reprod Biol* 6 Suppl 2:29-35
76. **Kimura T, Minai K, Matsui K, Mouri T, Sato T** 1976 Effect of various states of hydration on plasma ADH and renin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 42:79-87
77. **Gomori P, Varga I, Jakab L** 1958 The effect of humoral factors on renal function in dehydration. II. Antidiuretic hormone activity in dehydration. *Acta Med Acad Sci Hung* 11:369-70
78. **Hough LB** 1988 Cellular localization and possible functions for brain histamine: recent progress. *Prog Neurobiol* 30:469-505
79. **Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M** 1991 Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 71:1-51
80. **Hatton GI, Yang QZ** 2001 Ionotropic histamine receptors and H2 receptors modulate supraoptic oxytocin neuronal excitability and dye coupling. *J Neurosci* 21:2974-82
81. **Kjaer A, Knigge U, Rouleau A, Garbarg M, Warberg J** 1994 Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology* 135:675-81

82. **Smith BN, Armstrong WE** 1993 Histamine enhances the depolarizing afterpotential of immunohistochemically identified vasopressin neurons in the rat supraoptic nucleus via H1-receptor activation. *Neuroscience* 53:855-64
83. **Weiss ML, Yang QZ, Hatton GI** 1989 Magnocellular tuberomammillary nucleus input to the supraoptic nucleus in the rat: anatomical and in vitro electrophysiological investigations. *Neuroscience* 31:299-311
84. **Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Moller M, Warberg J** 1994 Histamine stimulates c-fos expression in hypothalamic vasopressin-, oxytocin-, and corticotropin-releasing hormone-containing neurons. *Endocrinology* 134:482-91
85. **Kjaer A, Knigge U, Olsen L, Vilhardt H, Warberg J** 1991 Mediation of the stress-induced prolactin release by hypothalamic histaminergic neurons and the possible involvement of vasopressin in this response. *Endocrinology* 128:103-10
86. **Kjaer A, Knigge U, Warberg J** 1995 Involvement of oxytocin in histamine- and stress-induced ACTH and prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 61:704-13
87. **Tuomisto L, Eriksson L, Fyhrquist F** 1980 Vasopressin release by histamine in the conscious goat. *Eur J Pharmacol* 63:15-24
88. **Tuomisto L, Eriksson L, Fyhrquist F** 1984 Plasma vasopressin levels after I.C.V. infusion of histamine agonists in the conscious goat. *Agents Actions* 14:558-60
89. **Dogterom J, van Wimersma Greidanus TB, De Wied D** 1976 Histamine as an extremely potent releaser of vasopressin in the rat. *Experientia* 32:659-60
90. **Kjaer A** 1996 Neurohypophysial peptides. Histaminergic regulation and function in adenohypophysial secretion. *Dan Med Bull* 43:391-406
91. **Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Jorgensen H, Warberg J** 1998 Neuronal histamine and expression of corticotropin-releasing hormone, vasopressin and oxytocin in the hypothalamus: relative importance of H1 and H2 receptors. *Eur J Endocrinol* 139:238-43
92. **Sakurai T** 2006 Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:313-25
93. **Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S** 2001 A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-8
94. **Jain MR, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP** 2000 Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul Pept* 87:19-24
95. **Jaszberenyi M, Bujdoso E, Telegdy G** 2001 The role of neuropeptide Y in orexin-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activation. *J Neuroendocrinol* 13:438-41
96. **Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T** 2002 Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav* 77:251-7
97. **Rauch M, Riediger T, Schmid HA, Simon E** 2000 Orexin A activates leptin-responsive neurons in the arcuate nucleus. *Pflugers Arch* 440:699-703
98. **Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K,**

- Nakazato M** 2003 Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-12
99. **Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T** 2000 Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859:404-9
 100. **Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T** 1998 Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402:460-74
 101. **Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S** Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44:133-8
 102. **Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K** 2001 Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-32
 103. **Harfstrand A** 1987 Brain neuropeptide Y mechanisms. Basic aspects and involvement in cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Acta Physiol Scand Suppl* 565:1-83
 104. **Willoughby JO, Blessing WW** 1987 Neuropeptide Y injected into the supraoptic nucleus causes secretion of vasopressin in the unanesthetized rat. *Neurosci Lett* 75:17-22
 105. **Leibowitz SF, Sladek C, Spencer L, Tempel D** 1988 Neuropeptide Y, epinephrine and norepinephrine in the paraventricular nucleus: stimulation of feeding and the release of corticosterone, vasopressin and glucose. *Brain Res Bull* 21:905-12
 106. **Sato K, Crofton JT, Wang YX, Share L** 1995 Effects of gender on the central actions of neuropeptide Y and norepinephrine on vasopressin and blood pressure in the rat. *Brain Res* 689:71-8
 107. **Ishizaki S, Murase T, Sugimura Y, Kakiya S, Yokoi H, Tachikawa K, Arima H, Miura Y, Oiso Y** 2002 Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* 143:1589-93
 108. **Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I** 2001 Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37:1382-7
 109. **Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS** 2001 Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol* 13:421-4
 110. **Finger FW, Reid LS** 1952 The effect of water deprivation and subsequent satiation upon general activity in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 45:368-72
 111. **Hall JF** 1955 Activity as a function of a restricted drinking schedule. *J Comp Physiol Psychol* 48:265-6
 112. **Tsunematsu T, Fu LY, Yamanaka A, Ichiki K, Tanoue A, Sakurai T, van den Pol AN** 2008 Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in orexin/hypocretin neurons: implications for water homeostasis. *J Neurosci* 28:228-38

113. **Mason WT** 1980 Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* 287:154-7
114. **Pirnik Z, Mravec B, Kiss A** 2004 Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochem Int* 45:597-607
115. **Arnhold MM, Wotus C, Engeland WC** 2007 Differential regulation of parvocellular neuronal activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following single vs. repeated episodes of water restriction-induced drinking. *Exp Neurol* 206:126-36
116. **Molnar A, Balaspiri L, Galfi M, Laszlo F, Varga C, Berko A, Laszlo FA** 2005 Inhibitory effects of different galanin compounds and fragments on osmotically and histamine-induced enhanced vasopressin secretion in rats. *Eur J Pharmacol* 516:174-9
117. **Leng G, Dyball RE, Luckman SM** 1992 Mechanisms of vasopressin secretion. *Horm Res* 37:33-8
118. **Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hokfelt T** 1990 Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260:279-97
119. **Yagil C, Sladek CD** 1990 Osmotic regulation of vasopressin and oxytocin release is rate sensitive in hypothalamoneurohypophyseal explants. *Am J Physiol* 258:R492-500
120. **Radacs M, Galfi M, Juhasz A, Varga C, Molnar A, Laszlo F, Laszlo FA** 2006 Histamine-induced enhancement of vasopressin and oxytocin secretion in rat neurohypophyseal tissue cultures. *Regul Pept* 134:82-8
121. **Lemay A, Brouillette A, Denizeau F, Lavoie M** 1979 Melatonin-and serotonin-stimulated release of vasopressin from rat neurohypophysis in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 14:157-66
122. **Iovino M, Steardo L** 1985 Effect of substances influencing brain serotonergic transmission on plasma vasopressin levels in the rat. *Eur J Pharmacol* 113:99-103
123. **Pergola PE, Sved AF, Voogt JL, Alper RH** 1993 Effect of serotonin on vasopressin release: a comparison to corticosterone, prolactin and renin. *Neuroendocrinology* 57:550-8
124. **Holzbauer M, Racke K** 1985 The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* 63:97-116
125. **Brooks DP, Share L, Crofton JT** 1986 Central adrenergic control of vasopressin release. *Neuroendocrinology* 42:416-20
126. **Day TA, Renaud LP** 1984 Electrophysiological evidence that noradrenergic afferents selectively facilitate the activity of supraoptic vasopressin neurons. *Brain Res* 303:233-40
127. **Cole RL, Sawchenko PE** 2002 Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 22:959-69
128. **Leibowitz SF** 1973 Histamine: a stimulatory effect on drinking behavior in the rat. *Brain Res* 63:440-4

129. **Negro-Vilar A** 1982 The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. *Peptides* 3:305-10
130. **Roberts F, Calcutt CR** 1983 Histamine and the hypothalamus. *Neuroscience* 9:721-39
131. **Kaminski T, Smolinska N, Nitkiewicz A, Przala J** Expression of orexin receptors 1 (OX1R) and 2 (OX2R) in the porcine pituitary during the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 117:111-8
132. **Zhang S, Blache D, Vercoe PE, Adam CL, Blackberry MA, Findlay PA, Eidne KA, Martin GB** 2005 Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regul Pept* 124:81-7
133. **Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P** 2001 Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142:3324-31
134. **Lehmann E, Hanze J, Pauschinger M, Ganten D, Lang RE** 1990 Vasopressin mRNA in the neurolobe of the rat pituitary. *Neurosci Lett* 111:170-5
135. **Terrier C, Chabot JG, Pautrat G, Jeandel L, Gray D, Lutz-Bucher B, Zingg HH, Morel G** 1991 Arginine-vasopressin in anterior pituitary cells: in situ hybridization of mRNA and ultrastructural localization of immunoreactivity. *Neuroendocrinology* 54:303-11
136. **Loh YP, Castro MG, Zeng FJ, Patel-Vaidya U** 1988 Presence of pro-vasopressin mRNA, neurophysin and arginine vasopressin in mouse anterior pituitary cells and the AtT-20 corticotrophic tumour cell line. *J Mol Endocrinol* 1:39-48
137. **Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM** 1998 Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-5
138. **Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ** 2000 Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 37:335-44
139. **Johren O, Bruggemann N, Dendorfer A, Dominiak P** 2003 Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology* 144:1219-25
140. **Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A** 2001 Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1616-9
141. **Eriksson KS, Sergeeva OA, Haas HL, Selbach O** 2010 Orexins/hypocretins and aminergic systems. *Acta Physiol (Oxf)* 198:263-75
142. **Li Y, van den Pol AN** 2005 Direct and indirect inhibition by catecholamines of hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci* 25:173-83
143. **Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T** 2004 Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT1A receptor. *J Neurosci* 24:7159-66
144. **Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T** 2003 Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 303:120-9

145. **Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan JL, Wang QP, Tominaga M, Goto K, Shioda S, Sakurai T** 2002 Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1237-45
146. **Puskas N, Papp RS, Gallatz K, Palkovits M** 2010 Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. *Peptides* 31:1589-97
147. **Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van Den Pol AN** 1999 Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415:145-59
148. **van den Pol AN, Ghosh PK, Liu RJ, Li Y, Aghajanian GK, Gao XB** 2002 Hypocretin (orexin) enhances neuron activity and cell synchrony in developing mouse GFP-expressing locus coeruleus. *J Physiol* 541:169-85
149. **Bubser M, Fadel JR, Jackson LL, Meador-Woodruff JH, Jing D, Deutch AY** 2005 Dopaminergic regulation of orexin neurons. *Eur J Neurosci* 21:2993-3001
150. **Fadel J, Deutch AY** 2002 Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 111:379-87
151. **Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T** 2000 Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 873:181-7
152. **Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK** 2002 Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22:9453-64
153. **Ishizuka T, Yamamoto Y, Yamatodani A** 2002 The effect of orexin-A and -B on the histamine release in the anterior hypothalamus in rats. *Neurosci Lett* 323:93-6
154. **Hein L, Kobilka BK** 1997 Adrenergic Receptors From Molecular Structure to in vivo function. *Trends Cardiovasc Med* 7:137-45
155. **Memo M, Missale C, Carruba MO, Spano PF** 1986 Pharmacology and biochemistry of dopamine receptors in the central nervous system and peripheral tissue. *J Neural Transm Suppl* 22:19-32
156. **Repka-Ramirez MS** 2003 New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep* 3:227-31
157. **Hynie S** 1995 [5-hydroxytryptamine (serotonin) receptors--nomenclature and classification of types and subtypes]. *Cesk Fysiol* 44:135-8
158. **Treiman M, Greengard P** 1985 D-1 and D-2 dopaminergic receptors regulate protein phosphorylation in the rat neurohypophysis. *Neuroscience* 15:713-22
159. **Sladek CD, Kapoor JR** 2001 Neurotransmitter/neuropeptide interactions in the regulation of neurohypophyseal hormone release. *Exp Neurol* 171:200-9
160. **Randle JC, Bourque CW, Renaud LP** 1986 Alpha 1-adrenergic receptor activation depolarizes rat supraoptic neurosecretory neurons in vitro. *Am J Physiol* 251:R569-74
161. **Jorgensen H, Riis M, Knigge U, Kjaer A, Warberg J** 2003 Serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion. *J Neuroendocrinol* 15:242-9
162. **Eriksson L, Tuomisto L** 1978 Effects of centrally infused histamine (HA) and its analogues in the conscious goat. *Acta physiol scan* 102:A23-24

- 163. **Nagyeri G, Galfi M, Radacs M, Molnar AH, Laszlo F, Varga C, Laszlo FA** 2009 Effects of galanin-monoaminergic interactions on vasopressin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures. *Regul Pept* 155:76-80
- 164. **Meister B, Hakansson ML** 1998 [Orexins--new hypothalamic peptides that stimulate appetite]. *Lakartidningen* 95:5885-7
- 165. **Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M** 2003 Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 60:72-87
- 166. **Smart D** 1999 Orexins: a new family of neuropeptides. *Br J Anaesth* 83:695-7
- 167. **Smart D, Jerman J** 2002 The physiology and pharmacology of the orexins. *Pharmacol Ther* 94:51-61
- 168. **Malherbe P, Borroni E, Pinard E, Wettstein JG, Knoflach F** 2009 Biochemical and electrophysiological characterization of almorexant, a dual orexin 1 receptor (OX1)/orexin 2 receptor (OX2) antagonist: comparison with selective OX1 and OX2 antagonists. *Mol Pharmacol* 76:618-31

Tudományos publikációk listája

Összesített impakt faktor: 21,222

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 7,924

The osmotically and histamine-induced enhancement of the plasma vasopressin level is diminished by intracerebroventricularly administered orexin in rats

Gyöngyi K. Kis, Andor H. Molnár, Lejla Daruka, János Gardi, Kinga Rákosi, Ferenc László, Ferenc A. László, Csaba Varga

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2012) Accepted IF: 3,354

The effects of orexins on monoaminergic-induced changes in vasopressin level in rat neurohypophyseal cell cultures

Gyöngyi K. Kis, Tímea Ocskó, Márta Gálfi, Marianna Radács, Zsolt Molnár, Kinga Rákosi, Andor H. Molnár, Ferenc László, Csaba Varga, Ferenc A. László
Neuropeptides (2011) 45: 385-389. IF: 1,917

Effects of orexin-monoaminergic interactions on oxytocin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures

Tímea Ocskó, Márta Gálfi, Mariann Radács, Zsolt Molnár, **Gyöngyi K. Kis**, Kinga Rákosi, Andor H. Molnár, Ferenc László, Csaba Varga, Ferenc A. László
Regulatory Peptides (2012) Accepted IF: 2,473

A disszertáció alapjául szolgáló referált absztrakt:

Effects of orexins on water intake and vasopressin secretion in rat

G.K. Kis, L. Daruka, K. Rákosi, AH. Molnár, F. László, Cs. Varga, F.A. László
Acta Physiologica (2011) Volume 202, Supplement 684 :P39 IF: 3,138

Az értekezés témájához nem tartozó idézhető közlemények:

Gervain Mihály, Vörös Erika, Molnár Andor, **Karcsú-Kis Gyöngyi**, László Ferenc, László A. Ferenc

Combined Treatment with Buserelin+Cabergoline in Patient with Prostate Cancer and Pituitary Macroprolactinoma.

J Cancer Therapy 2010; (1): 214-218. IF: 0,00

Tari I, **Kiss G** , Deer AK , Csiszar J, Erdei L , Galle A, Gemes K , Horvath F, Poor P, Szepesi A, Simon LM

Salicylic acid increased aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress.

Biologia Plantarum 2010; 54(4): 677-683. IF: 1,656

Mihály András, **Karcsú-Kis Gyöngyi**, Bakos Mónika, Bálint Erika

Cellular distribution of B-Raf protein kinase in the brainstem of the adult rat. A fluorescent immunohistochemical study.

Acta Biol. Szeged. 2007; 51; 7-15. IF: 0,000

Bereczki L, **Kis G**, Bagdi E, Krenacs L.

Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples.

Pathol Oncol Res. 2007;13(3):209-14. IF: 1,272

Krenacs L, Schaerli P, **Kis G**, Bagdi E.

Phenotype of neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is consistent with activated follicular B helper T cells.

Blood. 2006; 1;108(3):1110-1. IF: 10,370

A disszertáció alapjául szolgáló poszter prezentációk:

GK Kis, M Gálfi, M Radács, K Kádár, Z Molnár, AH Molnar, F László, C Varga, FA László

Effects of orexin-monomaminergic interactions on vasopressin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures

13th European Congress of Endocrinology

30 April – 4 May 2011, Rotterdam, The Netherlands

Karcsúné Kis Gyöngyi, Daruka Leila, Rákosi Kinga, Molnár H. Andor, Varga Csaba, László Ferenc, László A. Ferenc

Orexinek hatásának vizsgálata a vízháztartásra és a plazma vazopresszin szintjére patkányban

Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, 2011. június 8-11., Pécs

Az értekezés témájához nem tartozó poszter prezentációk:

Molnár Andor, **Karcsúné Kis Gyöngyi**, Rákosi Kinga, Miski Scerif, Korbonits Márta

Orexin-A hatása a bőr alatti és hasi zsírszövet AMPK aktivitására

„Sport- Kultúra- Életminőség” Nemzetközi Sporttudományi Konferencia, Pécs, 2010. október 27-29.

Ferenc A. László, Mihály Gervain, Erika Vörös, Andor H. Molnár, **Gyöngyi Karcsú-Kis**, Ferenc László

Macroprolactinoma after chronic buserelin treatment in patient with prostate cancer

12th European Congress of Endocrinology; 24-28 April 2010; Prague, Czech Republic

Karcsúné Kis Gyöngyi, Weiczner Roland, Krecsmarik Mónika, Mihály András
Raf-protein kinázok sejtszintű immunhisztokémiai lokalizációja patkány
agytörzsben.

XI. MITT Konferencia, Szeged, 2007. január 24-27.

Ideggyógyászati Szemle 2007; 60(S1):31p.

Kis Gyöngyi, Bereczki László, DR. Bagdi Enikő, DR. Krenács László

In situ hibridizáció alkalmazása a tumordiagnosztikában

V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006. május 4-6.

Tari I, Simon LM, Deér KA, Csistár J, Bajkán Sz, **Kis Gy**, Szepesi Á

Influence of Salicylic Acid on Salt Stress Acclimatization of Tomato Plants:
Oxidative Stress Responses and Osmotic Adaptation

Federation of European Societies of Plant Biology: The 14th FESPB Congress,
August 23-27., 2004., Cracow, Poland

Hencová Mária, Kissné Deér Aranka, **Kis Gyöngyi**, Ábrahámné Gulyás
Magdolna

Kadmium hatása busa és harcsa máj citokróm P450-függő enzimrendszerére

Szegedi Akadémiai Bizottság Kémiai Szakbizottság Környezetvédelmi és
Analitikai Munkabizottság: „The 10th Symposium on Analytical and Environmental
Problems”,

Szeged, 2003. szeptember 29.